



Revisión

Epidemiología, detección de resistencias y tropismo de VIH-1: puesta al día

Epidemiology, detection of resistance and tropism of HIV-1: update

Miriam Albert Hernández¹ y Ángel San Miguel Hernández²

¹Servicio de Microbiología. Complejo Asistencial de Zamora. Hospital Virgen de la Concha. Zamora. Universidad de Salamanca. Salamanca. ²Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Río Hortega. Valladolid

Recibido: 31/03/2020
Aceptado: 12/05/2020

Correspondencia: Miriam Albert Hernández. Servicio de Microbiología. Complejo Asistencial de Zamora. Hospital Virgen de la Concha. Avda. de Requejo, 35. 49022 Zamora
e-mail: malbert@saludcastillayleon.es

Palabras clave:

VIH-1. Epidemiología. Resistencia a fármacos. Tropismo viral.

RESUMEN

La infección por VIH-1 supone el 98 % de casos a nivel mundial. Se caracteriza por su enorme diversificación y rápida evolución, marcada por una distribución geográficamente definida de varios virus genéticamente distintos. El VIH-1 pandémico actual está filogenéticamente dividido en 4 grupos: M, N, O y P. Solo el grupo M (9 subtipos y más de 98 formas recombinantes circulantes, -CRFs- en inglés) se ha diseminado a lo largo de África y al resto de continentes, siendo la distribución de subtipos y CRFs heterogénea (CRF02_AG es el más prevalente en Camerún). Dentro de algunos subtipos, la elevada variación genética ha derivado en la clasificación de sub-subtipos, en constante actualización. El subtipo más predominante en Europa es B, responsable de un 66 % de los casos y de un 11 % a nivel mundial y es del que más información se dispone y frente al que se han diseñado la mayoría de fármacos antirretrovirales (ARV). La emergente diversidad genética y dinamismo del VIH-1 precisa de constante monitorización, representando un reto para un óptimo diagnóstico y tratamiento. Diferentes métodos diagnósticos están disponibles para estudio de resistencias a ARV así como para determinar el tropismo del virus, fundamental para pautar Maraviroc (potente alternativa con escasas resistencias). Los métodos genotípicos son de elección para ambos propósitos aunque en la determinación de resistencias tienen más valor para

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

DOI: 10.20960/revmedlab.00014

Albert Hernández M, San Miguel Hernández A. Epidemiología, detección de resistencias y tropismo de VIH-1: puesta al día. Rev Med Lab 2020;1(1):10-20

detectar resistencia que para predecir sensibilidad. Los más empleados para la detección del tropismo viral son WebPSSM y Geno2Pheno-(G2P) siendo el algoritmo G2P con una tasa de falsos positivos del 5 % el que podría facilitar una predicción fiable en la práctica clínica.

Keywords:

HIV-1. Epidemiology. Drug resistance.
Viral tropism.

ABSTRACT

HIV-1 infection accounts for 98 % of cases worldwide. It is characterized by its enormous diversification and rapid evolution, marked by a geographically defined distribution of several genetically distinct viruses. The current pandemic HIV-1 is phylogenetically divided into 4 groups: M, N, O and P. Only the M group (9 subtypes and more than 98 circulating recombinant forms –CRFs-) has spread throughout Africa and the rest of continents, the distribution of subtypes and CRFs being heterogeneous (CRF02_AG is the most prevalent in Cameroon). Within some subtypes, the high genetic variation has led to the classification of sub-subtypes, constantly updated. The most predominant subtype in Europe is B, responsible for 66 % of cases and 11 % worldwide and for which the most information is available and against which most antiretroviral drugs (ARD) are designed. The emerging genetic diversity and dynamism of HIV-1 requires constant monitoring, representing a challenge for optimal diagnosis and treatment. Different diagnostic methods are available to study resistance to ARD as well as to determine the tropism of the virus, essential to guide Maraviroc (a powerful alternative with little resistance). Genotypic methods are of choice for both purposes, although in resistances determination they have more value to detect resistance than to predict sensitivity. The most used for viral tropism detection are WebPSSM and Geno2Pheno-(G2P), being the algorithm G2P with 5 % false positive rate which could provide a reliable prediction in clinical practice.

INTRODUCCIÓN

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) continúa siendo responsable de una de las enfermedades más devastadoras de la historia de la humanidad y causa más de 37 millones de infecciones, según los datos más recientes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1). Pertenece a la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus* y existen dos tipos de VIH: VIH-1 y VIH-2. La infección por el VIH-1 es la más prevalente y supone el 98 % de los casos totales que existen en el mundo. No se tiene tanta información del VIH-2, enfermedad similar pero de evolución mucho más lenta y benigna, que se limita casi exclusivamente a determinadas zonas de África Occidental. Durante los últimos 30 años, el VIH-1 ha evolucionado a diferentes subtipos e incluso sub-subtipos hasta convertirse en una epidemia altamente heterogénea estructurada en múltiples subepidemias, cada una de ellas influenciada por factores biológicos, conductuales y culturales (2-4). En los laboratorios de Análisis Clínicos y Microbiología, la determinación de resistencia genotípica del VIH-1 frente a fármacos antirretrovirales (ARV), así como la determinación de su tropismo (en caso de instaurar tratamiento con un antagonista de los correceptores CCR5), es

fundamental en el trabajo clínico-asistencial e imperativa en el caso de pacientes con fracaso virológico. En este sentido, las nuevas técnicas de biología molecular, secuenciación masiva y el apoyo de prácticas y fiables herramientas bioinformáticas son cruciales para facilitar esta labor a los facultativos especialistas. Asimismo, estas técnicas y herramientas están en constante actualización, adaptación y evolución, de manera que se requiere una puesta al día en las mismas.

EPIDEMIOLOGÍA

Genéticamente, el VIH-1 se caracteriza por su enorme diversificación y rápida evolución (5). El VIH-1 pandémico actual está filogenéticamente dividido en 4 grupos diferentes denominados M ("main" o principal por su mayor prevalencia), N (no-M/no-O), O (atípicos) y el más reciente P (6-8). La recombinación genética parece ser un factor importante en dicha diversificación genética (9). Además, a pesar de la fuente viral común, los grupos VIH-1 mostraron patrones diferenciales de propagación en todo el mundo (10-12). Los virus pertenecientes a los grupos N, O, y P están principalmente restringidos a Camerún y países aledaños, aunque se

han detectado algunas de estas variantes fuera de esta región (10,13). Por el contrario, los virus grupo M se han diseminado de manera pandémica y son responsables de la mayoría de casos de infección por VIH a nivel mundial. Actualmente, el grupo M epidémico está formado a su vez por 9 subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J, K) y más de 98 formas recombinantes (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>). Solo el VIH-1 grupo M se ha diseminado a lo largo de África y a todos los otros continentes, siendo la distribución de sus subtipos y *Circulating Recombinant Forms* (CRFs) heterogénea. Dentro de algunos subtipos, la elevada variación genética ha derivado en la clasificación de sub-subtipos. Así, el subtipo A ha sido subdividido en A1, A2, A3, A4, A5, A6 y el más reciente descubierto el A7; el subtipo D en D1, D2, D3 y el F en F1 y F2 (6,14-16). Esta elevada tasa evolutiva asociada especialmente a los subtipos dentro del grupo M del VIH-1, puede afectar al desarrollo de la pandemia, de modo que ha sido posible su utilización como potente marcador epidemiológico para rastrear el curso de la misma. Sin embargo, a pesar del uso potencial de las diferencias genéticas evolutivas como marcador en estudios epidemiológicos sobre el origen y la diseminación de la pandemia, no está claro si estas variantes genéticas influyen en el resultado clínico de la infección por VIH-1 (17). Algunos estudios sugieren que el subtipo viral puede afectar a la transmisión, progresión de la enfermedad y la tasa evolutiva, y además puede

afectar potencialmente a la resistencia a los fármacos antivirales (18-22). El subtipo más frecuente en Europa es el B, responsable de aproximadamente un 66 % de todos los casos (23) y de un 11 % a nivel mundial (24); es, además, del que más información se dispone actualmente y frente al que se han diseñado la mayoría de los fármacos antirretrovirales (25). Hasta la fecha, se han detectado 4 variantes genéticas diferentes del subtipo B: subtipo B', que circula principalmente en Tailandia y otros países asiáticos; una variante específica hallada primordialmente en Trinidad y Tobago; la variante GPGS, descrita primariamente en Corea; y la variante GWGR, detectada principalmente en Brasil (24). Estas variantes representan subclados bien establecidos del subtipo VIH-1 que circulan en regiones específicas alrededor del mundo (19,26-29).

La vigilancia constante de las variantes virales emergentes de subtipos no B es crítica para asegurar que las pruebas sanguíneas de cribado y diagnósticas detectan todas las infecciones independientemente de la cepa o localización geográfica. En un estudio realizado en el sur de Camerún (30) la caracterización molecular de 555 muestras de VIH-1 identificó gran diversidad: 7 subtipos, 12 CRFs, 6 no clasificados, 24 grupo O y 2 grupo N. Otro estudio, analizando esta vez el noroeste de Camerún (14), concluyó que CRF02_AG era el más prevalente y además podría tener importantes consecuencias clínicas y de salud pública. Dentro de los CRFs descritos, el VIH-1 CRF01_AE recombinante

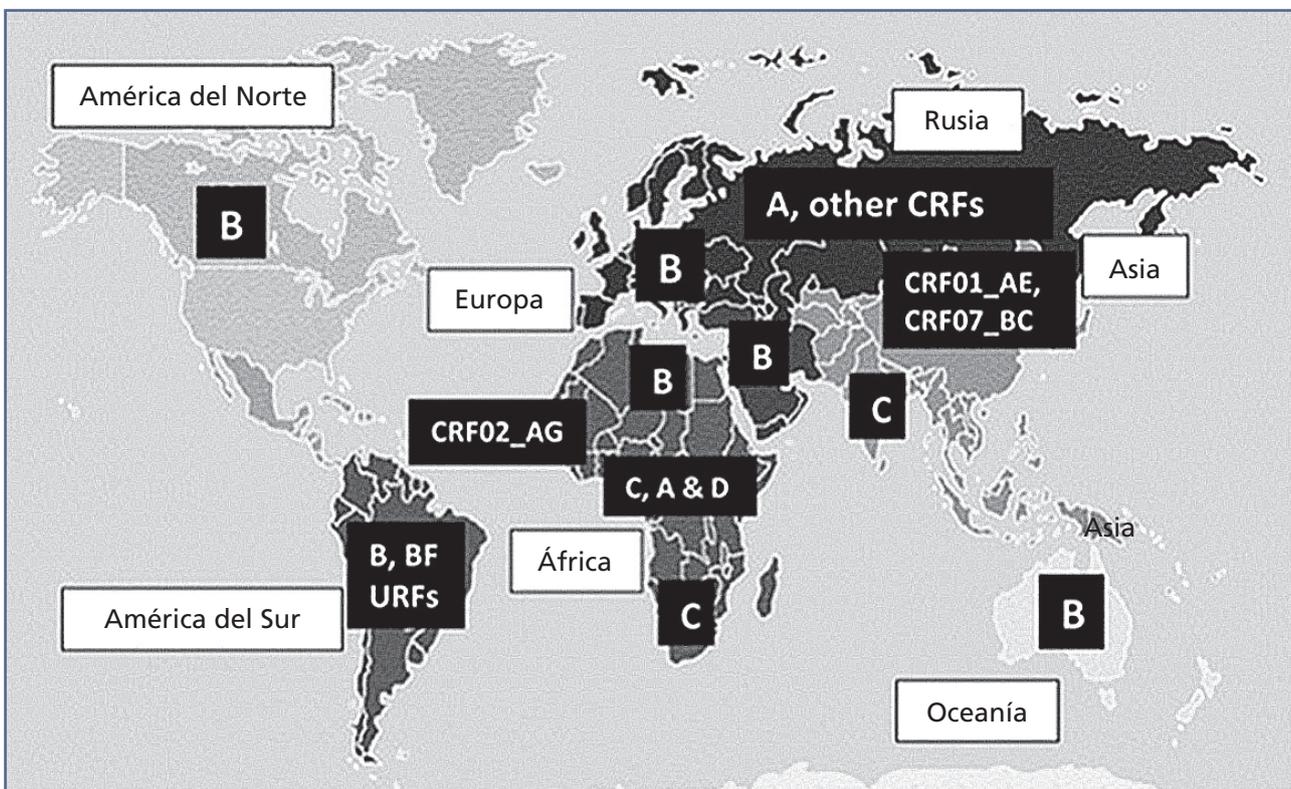


Figura 1 – Distribución global de los principales subtipos de VIH-1 y CRFs. Modificado de Bbossa N, et al. HIV subtype diversity world-wide. *Curr Opin HIV AIDS* 2019, 14:153-60 usando como fuente: map-menu.com.

es dominante en Asia (Fig. 1) donde la prevalencia es del 84 % y ha contribuido hasta un 4,6 % del total de infecciones VIH-1 en términos de distribución mundial (31). En algunos países europeos, el CRF01_AE fue el segundo mayor recombinante entre los subtipos VIH-1 no B después de CRF02_AG recombinante (32,33). Varios estudios subrayan la elevada prevalencia de tropismo X4 para CRF01_AE recombinante asociado con una posible rápida progresión de la enfermedad (34).

Epidemiológicamente, existen intrigantes diferencias en la distribución de los casos VIH y/o síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) entre distintos grupos de riesgo en Europa (35). En Europa Occidental y Central los hombres que tienen sexo con hombres (HSH) son el principal grupo de pacientes infectados (40,7 % y 28,3 % de los casos, respectivamente frente a un 4,4 % en Europa Oriental), mientras que la mayoría de los casos en Europa Oriental son usuarios de drogas inyectables (22,1 % frente a 3,1 % y 2,5 % en Europa Occidental y Central, respectivamente) (HIV/AIDS surveillance in Europe 2019) (36) (Tabla I). En cuanto

a la epidemiología molecular de VIH-1 en Europa todavía es altamente estratificada de acuerdo a género y grupo de riesgo. El subtipo B es significativamente más común en hombres que en mujeres y es todavía proporcionalmente mayor en HSH que en usuarios de drogas inyectables o individuos heterosexuales (23). Esta estratificación por grupos de riesgo está con gran probabilidad relacionada con el comienzo de la epidemia y puede reflejar la persistencia epidemiológica de los efectos precursores (24). Sin embargo, según el último informe anual europeo, los porcentajes globales en población homosexual (HSH) y heterosexual se van acercando (39,8 % vs. 32,5 %, respectivamente) (36). En Europa Occidental, el VIH-1 epidémico entre HSH está dominado por el subtipo B. Respecto a España, un reciente estudio (37) mostró que el VIH-1 epidémico entre HSH se está volviendo cada vez más diverso a través de la expansión de diversos clados de subtipos no B, que abarcan o están relacionados con virus que circulan en otros países.

Tabla I.
Características de los nuevos casos VIH informados en la OMS Región de Europa, 2018

	Región Europea (OMS)	Oeste	Centro	Este	EU/EEA
Países informantes/Número de países	50/53	23/23	15/15	12/15	31/31
Número de nuevos diagnósticos de VIH	141.552	23.483	6.519	111.550	26.164
Tasa por 100 000 habitantes	16,2	6,0	3,3	44,8	5,6
Porcentaje de edad de 15-24 años	8,8 %	10,3 %	13,5 %	6,0 %	10,6 %
Porcentaje de edad 50+ años	17,5 %	21,4 %	14,8 %	14,6 %	19,8 %
Relación hombre-mujer	1,8	2,9	5,6	1,6	3,1
Porcentaje de nuevos diagnósticos < 350 CD4/mm ³	52,8 %	48,8 %	54,6 %	55,5 %	49,4 %
Número de nuevos diagnósticos de SIDA	14.227	2.549	857	10.821	3.235
Tasa diagnóstico SIDA por 100.000 habitantes	2,0	0,6	0,4	10,5	0,6
Modo de transmisión					
Sexo entre hombres	22,6 %	40,7 %	28,3 %	4,4 %	39,8 %
Transmisión heterosexual (hombres)	25,9 %	15,8 %	20,5 %	36,6 %	15,6 %
Transmisión heterosexual (mujeres)	23,8 %	18,0 %	7,5 %	33,4 %	16,9 %
Uso de drogas inyectables	11,8 %	3,1 %	2,5 %	22,1 %	3,7 %
Vertical	0,6 %	0,7 %	0,4 %	0,6 %	0,7 %
Desconocida	15,0 %	21,2 %	40,7 %	2,8 %	22,7 %

Adaptado de European Centre For Disease Prevention and Control, WHO Regional Office for Europe. HIV/AIDS surveillance in Europe 2019 - 2018 data. EU: European Union (Unión Europea); EEA: European Economic Area (Área Económica Europea).

TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

El VIH posee una gran capacidad replicativa, generando en torno a 10^9 y 10^{10} viriones al día (38). Esto implica que durante su proceso de replicación la transcriptasa inversa (TI) continuamente comete errores, provocando la coexistencia de diferentes especies o cuasiespecies. Esta es una de las causas que explica por qué solo un fármaco para tratar la infección no es suficiente para evitar la posible y precoz resistencia del VIH al tratamiento establecido. Desde que se dispone de fármacos ARV con los que formar combinaciones potentes, se han logrado beneficios enormes en la reducción de la morbimortalidad y de la transmisión de la infección por el VIH-1. Paralelamente, el uso de estos fármacos ha adquirido gran complejidad por la aparición continua de diferentes fármacos en las distintas familias, así como sus múltiples facetas en cuanto a eficacia, toxicidad, resistencias, tropismo, interacciones, etc., y su uso en situaciones clínicas especiales, como la prevención de la transmisión (profilaxis pre-exposición).

Las terapias ARV disponibles actualmente permiten retrasar durante muchos años la aparición del SIDA y prolongan el periodo de estabilidad asintomática característico de las personas con VIH que aún tienen un sistema inmune lo suficientemente fuerte. El VIH se integra en el genoma de la célula huésped (ADN proviral), donde puede permanecer en estado de latencia durante periodos prolongados. El problema se agudiza por su capacidad para infectar distintas células y tejidos, de manera especial el sistema nervioso central al que muchos fármacos no pueden acceder en concentraciones útiles por su incapacidad para atravesar la barrera hematoencefálica.

Esta complejidad del VIH hace necesario diseñar de la manera más racional posible diversos esquemas terapéuticos dirigidos a actuar en las distintas etapas del ciclo de replicación viral. Hasta la fecha, se han comercializado fármacos ARV pertenecientes a 7 familias con actividad sobre las distintas etapas del ciclo de replicación viral (39). De ellas, cuatro inhiben enzimas del ciclo intracelular y el resto actúan antes de la entrada del retrovirus a la célula diana. No es objeto de esta revisión entrar en detalle del tratamiento ARV pero a continuación estas familias se describen brevemente, y especialmente, el antivírico Maraviroc (MRV) puesto que es objeto de determinados métodos diagnósticos para optimizar su efectividad en los pacientes.

- *Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos/nucleótidos (ITIAN/ITIANt)*. Previamente a su acción, en el interior de la célula diana, tiene lugar una transformación metabólica de estos fármacos consistente en la incorporación de 3 o 2 moléculas de fosfato, respectivamente, para ser activos. A continuación inhiben a la TI mediante su incorporación a la cadena de ADN impidiendo así la replicación del genoma viral. El grupo de ITIAN es numeroso e incluye, entre otros, ab-

cavair, emtricitabina, lamivudina, zidovudina... mientras que tenofovir (TDF) (con sus formulaciones TDF disoproxil fumarato y TDF alafenamida) es el único integrante de ITIANt.

- *Inhibidores no análogos de nucleósidos (ITINN)* que inhiben también a la TI, pero que en este caso no precisan transformarse para ser activos. Algunos ejemplos son nevirapina, efavirenz, rilpivirina...
- *Inhibidores de la proteasa (IP)* que actúan al final del ciclo intracelular. Al bloquear a la proteasa del VIH, la poliproteína sintetizada por el virus no puede cortarse por los lugares adecuados, impidiendo así el ensamblaje de nuevas partículas virales. Esta familia incluye diferentes fármacos (atazanavir, darunavir, lopinavir, tipranavir...) que para aumentar su efectividad siempre se emplean potenciados con dosis bajas de ritonavir o cobicistat; este último en caso de atazanavir o darunavir.
- *Inhibidores de la integrasa (IG)* que inhiben uno de los pasos (la reacción de transferencia de la cadena) del complejo proceso de la integración del ADN proviral del VIH en el ADN de la célula huésped. Es un grupo de fármacos en constante desarrollo y hasta la fecha disponemos de raltegravir, elvitegravir, dolutegravir y bictegravir.
- *Inhibidores de la fusión* que actúan en el primer paso del ciclo de infección viral y se unen a las glicoproteínas (gp) de la cubierta del virus necesarias para que este se adhiera y penetre en la célula huésped. En concreto, enfuvirtida (único fármaco de este grupo y poco utilizado en la actualidad) bloquea la unión de la gp41 al receptor.
- *Antagonistas de los correceptores*. MVC es un potente antagonista selectivo del correceptor CCR5 con actividad antiviral frente a aquellos aislados de VIH que usan este receptor para ingresar a los linfocitos T CD4+ (cepas R5) pero no contra aquellas usuarias de CXCR4 (cepas X4). Es capaz de bloquear la unión de la gp120 del VIH con el correceptor CCR5. Ha sido aprobado para su uso en pacientes con resistencia a otras familias de ARV ya que se prevé una elevada barrera para la adquisición de resistencia dada su unión extracelular a la molécula conservada CCR5. Sin embargo, a pesar de dicha limitación estructural, se han descrito aislados resistentes a MVC *in vivo* (40) (Fig. 2). En cualquier caso, sigue siendo una alternativa excelente con escasas resistencias y, debido a su particular mecanismo de acción, los pacientes deben realizarse una prueba diagnóstica de tropismo viral para asegurarse de que su cepa utiliza al receptor CCR5.
- *Inhibidores posfijación*. Esta familia representada únicamente hasta la fecha por ibalizumab (anticuerpo monoclonal autorizado en marzo de 2018 por la FDA) exhibe un mecanismo de acción diferente, bloqueando los receptores CD4 en la superficie de determinados inmunocitos que el VIH necesita para entrar a las células (www.infosida.nih.gov) (41).

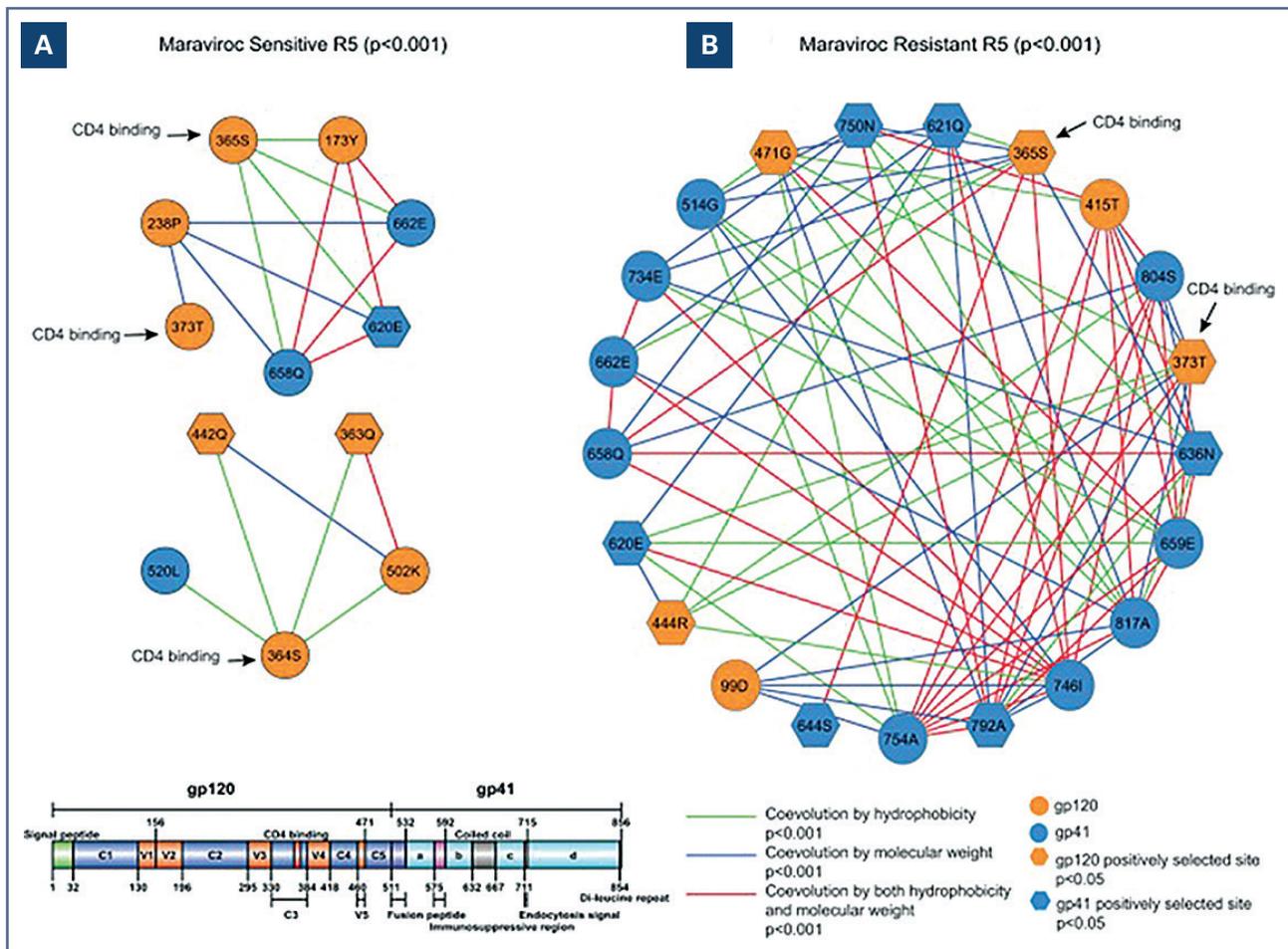


Figura 2 – Redes de covariación de los sitios de unión a CD4 asociados con hidrofobicidad y/ peso molecular para virus sensibles (A) y resistentes (B) R5. Los sitios de covariación se mapean a la estructura cristalina de la proteína gp120. Los sitios bajo selección positiva se muestran como hexágonos. Tomado de Jiang X, et al. Characterizing the diverse mutational pathways associated with R5-tropic Maraviroc resistance: HIV-1 that uses the drug-bound CCR5 coreceptor. *J Virol* 2015;89:11457-72.

Las pautas recomendadas para el tratamiento inicial de la infección por el VIH-1 en el momento actual consisten en una combinación de dos o tres fármacos. La terapia triple incluye dos ITIAN asociados a un ITINN, a un IP, o a un IG.

PRUEBAS DE DETECCIÓN DE RESISTENCIAS PARA EL VIH

En la actualidad existen dos tipos de pruebas para la detección de resistencias a la terapia ARV: fenotípicas y genotípicas. Ambas ayudan a determinar a qué fármacos el VIH no responderá: las fenotípicas, consistentes en enfrentar al virus a diferentes concentraciones de un determinado fármaco y establecer el grado de inhibición comparando con cepas control, y las genotípicas, que emplean el análisis de la secuencia de ácidos nucleicos del virus para detectar la presencia de mutaciones de resistencia. Las pruebas genotípicas son las que tienen mayor difusión entre los laboratorios de

diagnóstico, mientras que los ensayos fenotípicos quedan reservados para laboratorios de investigación. Actualmente la utilización de las pruebas de resistencias se recomiendan en todas las guías de práctica clínica sobre tratamiento ARV. Se estima que la prevalencia global en España de resistencias primarias en los genes de la transcriptasa inversa y la proteasa es del 7,9 %. Por ello, se recomienda realizar un estudio genotípico de resistencias del VIH-1 en la TI y en la proteasa en todos los pacientes antes de iniciar el tratamiento ARV y solamente debe valorarse ampliar el estudio de resistencias a los IG antes de iniciar el tratamiento si hay evidencia de transmisión a partir de un paciente tratado con estos fármacos y/o se observa fracaso virológico (39).

Pruebas genotípicas

Estas pruebas exigen que la base molecular de las resistencias esté suficientemente caracterizada, de tal

forma que la detección de una mutación sea predictiva de la falta de actividad de un determinado antivírico. Analizan muestras sanguíneas con VIH, con o sin fracaso virológico según el caso, para determinar si existen mutaciones en la secuencia primaria de nucleótidos del gen objeto de estudio (genes codificantes para la TI, proteasa, integrasa). Una vez que las mutaciones han sido identificadas, se comparan con amplias bases de datos que contienen una larga lista de mutaciones conocidas como causa de resistencia a determinados fármacos ARV. Estos resultados ayudarán a determinar qué fármacos ARV serían menos resistentes al VIH. Las pruebas genotípicas son de elección para la determinación de resistencias; tienen en general más valor para detectar resistencia (detección de una determinada mutación), que para predecir sensibilidad (ausencia de todas las posibles causas de resistencia). Los métodos comerciales más utilizados son TruGene® HIV-1 Genotyping Test (Siemens) y ViroSeq® HIV-1 Genotyping System (Abbott Diagnostics). El primero emplea la secuenciación bidireccional y la electroforesis en gel y permite investigar mutaciones en la TI y la proteasa, mientras que el segundo emplea el método unidireccional y la electroforesis capilar y permite investigar mutaciones en la TI, proteasa e integrasa. Ambos sistemas ofrecen un *software* para la edición de las secuencias y un algoritmo propio de interpretación. La secuencia obtenida por estos métodos de secuenciación poblacional es en realidad la secuencia promedio de todas las variantes presentes en la muestra original, siendo difícil detectar mutaciones que supongan menos del 10-20 % del total. Para asegurar la detección de las variantes que representan menos del 20 %, hemos de recurrir a otras técnicas: clonación de los productos de amplificación, PCR mediante diluciones límite o PCR-alelo específica a tiempo real, secuenciación masiva (42).

Pruebas fenotípicas

Las pruebas fenotípicas, en lugar de detectar mutaciones específicas, miden la capacidad de reproducción del VIH en presencia de fármacos ARV. La ventaja del este tipo de pruebas es que dice exactamente a qué fármacos se hará resistente el virus. Miden la concentración de fármaco necesario para inhibir la replicación viral en cultivo celular. Los resultados se expresan generalmente en forma de cambios en la IC_{50} (concentración de fármaco requerida para reducir al 50 % la producción viral *in vitro*), comparando con una cepa control. La interpretación del valor de IC_{50} es diferente dependiendo del fármaco implicado. En la actualidad los métodos más utilizados están basados en el empleo de virus recombinantes que consiguen una mayor rapidez y reproducibilidad en los resultados. Consisten en la obtención de la secuencia de los genes de TI y proteasa del plasma de un paciente por medio de RT-PCR y su introducción dentro de un sistema ya estandarizado para la producción de un VIH recombinante capaz de

infectar una línea celular, incluyendo un procedimiento que facilita la lectura de los resultados. Ejemplos de métodos con virus recombinantes comercializados son: Antivirogram® (Tibotec-Virco), Phenosense® (Virologic) y Phenoscript® (Viralliance-SAS). La interpretación de los resultados de estos ensayos, aunque más intuitiva y sencilla, no está exenta de complicaciones, ya que analizan la sensibilidad fármaco a fármaco, y en la vida real las combinaciones pueden suponer un comportamiento diferente del meramente aditivo (42).

Pruebas fenotípicas virtuales

Existe un tercer tipo de pruebas, combinación de las anteriores, denominadas fenotípicas virtuales. En primer lugar, se realiza una prueba genotípica para analizar si existen mutaciones. A continuación, se realizará una búsqueda, en una gran base de datos, del resultado de una prueba fenotípica de otra muestra de virus que tenga un patrón genotípico similar, es decir, se basa en la predicción del fenotipo a partir del genotipo. Un ejemplo de este tipo de herramientas es virco®Type HIV-1 que incorpora información sobre la resistencia a IP potenciados con ritonavir y, en determinados casos, incluye el consejo de expertos en la interpretación final (43). Estas muestras coincidentes pueden indicar cómo podría comportarse el virus. El fenotipo virtual es más rápido y menos caro que un test fenotípico, aunque, al igual que en el test genotípico, puede seguir siendo difícil predecir qué nuevos fármacos no responderán a virus muy resistentes.

PRUEBAS DE DETECCIÓN DE TROPISMO VIRAL

Los dos principales correceptores involucrados en la entrada *in vivo* del VIH a la célula diana (principalmente, linfocitos T CD4+) son el CXCR4 y el CCR5. La selectividad de los correceptores está determinada por las secuencias genéticas de la gp120, particularmente en la región V3 altamente variable y estructuralmente flexible (44). Aquellas cepas de VIH que utilizan el correceptor CXCR4 para ingresar a la célula pero no el CCR5, se denominan virus CXCR4 trópico o X4. Las otras son las CCR5 trópicas o R5. Existen además, cepas con tropismo mixto o dual, capaces de utilizar ambos correceptores designadas R5/X4.

En un paciente la población de virus circulante está compuesta por una población pura en la que todas las cepas comparten el mismo tropismo (virus R5, X4 o R5/X4) o una población mixta compuesta por virus con diferentes tropismos. CCR5 es el principal correceptor existente en aquellos pacientes que adquieren el retrovirus por vía sexual. Asimismo, es el receptor predominante en los estadios iniciales de la infección en tanto que las variantes usuarias de CXCR4 emergen más tarde en coincidencia con una pérdida acelerada de linfocitos T CD4+ y una progresión rápida de la enfermedad. La mayoría de los pacientes que son tratados precoz-

mente alojan solo cepas R5 mientras que en aquellos con múltiples fracasos terapéuticos emergen las cepas X4. Esto se expresa por lo general como cepas mixtas; son raras las poblaciones con predominio de X4 y aún en pacientes tratados la mayoría de las cepas son R5. Por todo lo expuesto es de utilidad, antes de iniciar un tratamiento con MVC así como en caso de fracaso del mismo, efectuar un estudio de tropismo del VIH-1, existiendo para ello métodos fenotípicos y genotípicos.

Pruebas fenotípicas

Las pruebas fenotípicas del tropismo (PFT) se basan en la generación de virus recombinantes. El gen de la envuelta es amplificado mediante RT-PCR a partir del plasma del paciente y mediante técnicas de clonaje o recombinación genética se generan virus quiméricos o pseudotipos que portan la envuelta del paciente. Estos virus son utilizados para infectar líneas celulares que expresan el receptor CD4 y uno de los dos correceptores principales del VIH-1, CCR5 o CXCR4. De esta manera, se define el tropismo viral conferido por la envuelta del paciente estudiado a partir del comportamiento del virus recombinante. La característica principal de estos métodos [ESTA-Trofile[®], TropiTest (Instituto de Salud Carlos III-Fundación FIPSE), Toulouse Tropism Test (Universidad de Toulouse)...] es conseguir amplificar la envuelta completa del VIH-1 del paciente. Este aspecto es relevante ya que aunque la región V3 contiene los principales determinantes del tropismo viral existen otras regiones implicadas (V1, V2, C4) (42). Se han descrito diferentes PFT de VIH-1 como la utilización de la línea celular GHOST [línea celular derivada del osteosarcoma humano que expresa en su superficie celular CD4 y varios receptores de quimiocinas (CCR5, CCR3, CCR5, CXCR4)] (45) de virus generados a partir de clones individuales empleando la luciferasa *Renilla* para determinar la actividad o PFT replicativa (46).

Estos ensayos constituyen todavía el método de referencia para caracterizar el tropismo viral por su gran sensibilidad para detectar las variantes minoritarias CXCR4 y/o CCR5 en los subtipos B y no-B del VIH-1. Además, representan el único método para medir la resistencia a los antagonistas de CCR5. Sin embargo, presentan, además de un precio elevado, complicaciones técnicas y en especial logísticas que dificultan su utilización en la práctica clínica (43); solo están disponibles comercialmente en unos pocos países (40).

Pruebas genotípicas

Las pruebas genotípicas del tropismo (PGT) se presentan como una alternativa más económica, rápida y factible de desarrollar localmente en cualquier laboratorio especializado de VIH-1 que cuente con tecnología para realizar la determinación de resistencias a ARV (43). Inicialmente, se describieron y desarrollaron

diferentes reglas y algoritmos de correlación genotipo-tropismo basados fundamentalmente en las características de la secuencia de aminoácidos de la región V3 de la envuelta viral. Las reglas genotípicas más simples como la regla 11/25, predicen X4 en base a la presencia de residuos básicos en la posición 11 o 25 de la región V3 (35 aminoácidos) de la gp120 del VIH-1 (47). Sin embargo, este algoritmo ha mostrado una sensibilidad limitada para la predicción del tropismo en las muestras clínicas actuales (48). Posteriormente, el estudio de la variabilidad natural en secuencias de V3 y su asociación con los fenotipos R5- o X4-tropicos, ha permitido la identificación de nuevos residuos y patrones de aminoácidos en la región V3 relacionados con el tropismo viral; cambios de polaridad (a arginina o lisina) en posiciones 11, 24 y 25 de dicha región determinarán el tropismo X4. Con los datos obtenidos y a través de la utilización de diferentes métodos estadísticos (Support Vector Machines-SVM, Position Specific Scoring Matrices-PSSM) y bioinformáticos se han diseñado sofisticados algoritmos de interpretación que permiten predecir el uso del correceptor del VIH-1 basándose en la secuencia genética de la región V3 de un determinado aislado viral. Algunos de ellos se encuentran disponibles en páginas web de libre acceso como son WetCat, Geno2pheno (G2P), WebPSSM y FortinbrasPSSM (42,49) (Tabla II). Diversos estudios han evaluado también la capacidad de predecir el tropismo viral combinando la información aportada por varios algoritmos, e incluso variables clínicas relacionadas con la infección por VIH-1. Estos métodos han conseguido mejorar la sensibilidad para detectar cepas X4, sin una pérdida significativa de especificidad (50).

El algoritmo de interpretación de más amplia difusión utilizado en los últimos años ha sido G2P[correceptor] (51); el método estadístico que utiliza para hacer sus predicciones es SVM. G2P puede realizar las predicciones tanto a partir de la secuencia FASTA de nucleótidos como de aminoácidos de la región V3. La base de datos en la que basa sus predicciones consiste en secuencias de V3 que se corresponden con un fenotipo R5, otras con un fenotipo X4 y secuencias con fenotipo R5X4. Sin embargo, la mayoría de estas secuencias son subtipo B, aunque también incluye algunas secuencias de otros subtipos genéticos. En general, todas las herramientas para manejar las PGT han sido desarrolladas ante todo para VIH-1B aunque ahora se están aplicando también con secuencias V3 recientemente disponibles de VIH-1 no-subtipo B (52). El servidor utilizado en G2P permite seleccionar en cada predicción el grado de sensibilidad para detectar variantes X4 del VIH-1 subtipo B, seleccionando la tasa de falsos positivos (TFP) en cada una de las predicciones. Más recientemente, la herramienta denominada PhenoSeq ha sido desarrollada para ser predictiva con confianza para el tropismo del VIH-1 subtipos A, B, C, D, 01_AE y 02_AG (52,53).

La última versión de G2P oferta la posibilidad de introducir datos clínicos adicionales como la carga viral, número de CD4+ y la presencia o ausencia de la dele-

Tabla II.
Características de herramientas informáticas para la detección de tropismo viral

Herramienta	Método de predicción	Subtipo
T-CUP 2.0	Utiliza información estructural del bucle V3 modelando el potencial electrostático e hidrofobicidad; combinación de resultados por apilamiento	Subtipo B (principalmente) y C con 1351 secuencias (200X4 y 1151 R5)
Geno2pheno[coreceptor]	Máquina de vector de soporte para clasificación binaria	Subtipo B con 1100 secuencias (769 R5, 210X4, 131 R5X4) de 332 pacientes
PhenoSeq	Evaluación de la longitud del aminoácido V3 del VIH-1, carga de aminoácido neta, número de sitios ligados a N-glicosilación y la frecuencia de alteraciones de aminoácidos específicas del sitio	A, A1, A2, B, C, D, CRF_01_AE, CRF02_AG
WebPSSM x4r5	Matrices de puntuación, que reflejan la diferencia en la abundancia de un aminoácido particular en un sitio particular	Subtipo B
WebPSSM sinsi		Subtipo B
WebPSSM sinsiC		Subtipo C
Genotypic rule (Raymond et al.)	Regla 11/25 en combinación con una regla de carga neta	Subtipo C
Genotypic rule (Esbjörnsson et al.)	Reglas basadas en Raymond et al. con puntos de corte modificados de la carga neta media y recuento total de aminoácidos cargados	Subtipo A

Adaptado de Riemenschneider, et al. Genotypic prediction of co-receptor tropism of HIV-1 subtypes A and C. *Sci Rep* 2016;6:24883.

ción 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. Además, los estudios que comparan 3 métodos genotípicos para evaluar el tropismo de VIH-1 concluyen que el algoritmo G2P-TFP5 % (<https://coreceptor.geno2pheno.org/>) podría facilitar la predicción del tropismo en la práctica clínica (54). A pesar de la excelente concordancia de G2G[coreceptor] con las PFT para subtipo B y algunos otros subtipos se ha descrito que podría sobreestimar el tropismo X4 en aislados de Asia CRF01_AE. La nueva versión de G2P, denominada G2P[Sanger] (punto de corte: riesgo X4 < 36 %) presenta una elevada concordancia con las PFT en dichas cepas (55).

MVC es una potencial promesa para tratar en áreas no-subtipo B (principalmente países con bajos-medios ingresos). Por tanto, el uso óptimo de PGT con elevada previsibilidad en los subtipos no-B es requerido para tratar a estos pacientes con dicho fármaco (52). Para algunos aislados, las PFT revelan resultados discordantes con las PGT. Varios estudios actuales realizados en países donde el subtipo VIH-1C es el dominante, indican un incremento en la predicción de aislados con tropismo X4 a lo largo del tiempo (54,56). Los aislados VIH-1 procedentes del África del Este poseen una diversidad significativamente mayor en comparación con otros aislados VIH-1 de otras localizaciones geográficas como la India o Sudáfrica (57). En un reciente es-

tudio (52) se llevó a cabo la comparación entre ambas pruebas para aislados VIH-1C procedentes de África del Este, concluyendo que las PGT actuales sobreestiman el tropismo X4 en dichos aislados y que, a pesar de la ausencia de cambios en las envueltas V3, algunos aislados presentan tropismo dual. La mayor heterogeneidad en la envuelta V3 es común en estos aislados VIH-1C y puede falsamente limitar el uso de MVC. Otros autores indican que no solo las mutaciones en V3 sino también en regiones de gp120 y gp41 podían ser principalmente responsables de la variabilidad a MVC (40,58). Además, esta diferencia en la sensibilidad en VIH-1C parece específica de aislado (59). Estos datos se apoyan en un estudio en el que la inclusión de la secuencia completa gp120 mejora la predicción genotípica para virus VIH-1A y C (49). En cualquier caso, todos estos trabajos enfatizan la necesidad de mejorar los algoritmos actuales para las PGT, por ejemplo incluyendo segmentos más grandes de gp120 en la predicción del tropismo (52).

Al igual que para la determinación de resistencias, las nuevas plataformas de secuenciación masiva permiten superar las limitaciones de las técnicas convencionales de secuenciación poblacional, mediante la generación simultánea de centenares de secuencias clonales de virus. Sin embargo, hasta que estas plataformas simplifiquen su logística y la interpretación bioinformática de resultados, los métodos genotípicos representan actualmente la principal alternativa rápida, fiable y factible para la determinación del tropis-

mo viral en la práctica clínica. Un avance basado en la tecnología de secuenciación de próxima generación y, además, de acceso gratuito *on line*, es un sistema de interpretación genotípica denominado G2P [ngs-freq] (<http://ngs.geno2pheno.org>) que permite identificar mutaciones de resistencia en poblaciones minoritarias del VIH-1 (60).

CONSIDERACIONES FINALES

El VIH-1 pandémico actual está filogenéticamente dividido en 4 grupos diferentes (M, N, O y P. Solo el VIH-1 grupo M se ha diseminado a lo largo de África y al resto de continentes, siendo el subtipo B la variante más diseminada representando aproximadamente un 11 % de las infecciones a nivel mundial. Dentro de determinados subtipos, la elevada variabilidad genética ha derivado en la clasificación de sub-subtipos, en constante actualización (el subtipo A ha sido subdividido en A1, A2, A3, A4, A5, A6 y el más reciente descubierto el A7; el subtipo D en D1, D2, D3 y el F en F1 y F2). Treinta y nueve años después desde los primeros casos detectados, todavía existe una clara asociación entre contacto homosexual e infección por subtipo B en la mayoría de la subepidemias en todo el mundo. En Europa, el último informe anual (2019) refleja que los porcentajes globales de infección por VIH en población homosexual (HSH) y heterosexual se van acercando (39,8 % vs. 32,5 %, respectivamente). La diversidad viral y las coinfecciones pueden confundir el diagnóstico y tratamiento si no son diagnosticadas. Los métodos genotípicos son de elección tanto en la determinación de resistencias como de tropismo viral. Estos métodos tienen en general más valor para detectar resistencia que para predecir sensibilidad (ausencia de toda posible resistencia). La determinación del tropismo del VIH-1 para el tratamiento con MVC es diferente en función del algoritmo utilizado. Actualmente, las herramientas más empleadas son WebPSSM y G2P siendo el algoritmo G2P-TFP5 % el que podría facilitar la predicción fiable del tropismo en la práctica clínica en todos los subtipos. No obstante, se requiere una optimización de las pruebas genotípicas del tropismo en pacientes con elevada previsibilidad de subtipos no-B. Asimismo, la elevada prevalencia de tropismo X4 para CRF01_AE recombinante se ha asociado con una posible rápida progresión de la enfermedad. La emergente y dinámica diversidad genética del VIH-1 precisa de constante monitorización para alcanzar un correcto diagnóstico, tratamiento así como avances en el desarrollo de vacunas. Las técnicas de secuenciación masiva de última generación, una vez solventadas las limitaciones, serán las más sensibles en la detección de mutaciones en las variantes genéticas minoritarias del VIH-1. En este sentido la nueva herramienta bioinformática G2P [ngs-freq] contribuye a tomar decisiones clínicas e investigar el impacto de las mutaciones de resistencia de baja prevalencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. VIH/SIDA. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids> [Consultado 23 de marzo de 2020]
2. Tebit DM, Arts EJ. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. *Lancet Infect Dis* 2011;11:45-56.
3. Beyrer N, Davis C, Jenkins A, et al. The increase in global HIV epidemics in MSM. *AIDS* 2013;27:2665-78.
4. Brenner BG, Wainberg M. Future of phylogeny in HIV prevention. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013;63(Suppl. 2):S248-54.
5. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med* 2012;18:182-92.
6. Désiré N, Cerutti L, Le Hingrant Q, et al. Characterization update of HIV-1 M subtypes diversity and proposal for subtypes A and D sub-subtypes reclassification. *Retrovirology* 2018;15:80.
7. Bbossa N, Kaleebu P, Ssemwanga D. HIV subtype diversity worldwide. *Curr Opin HIV AIDS* 2019, 14:153-60.
8. Aldrich C, Hemelaar J. Global HIV-1 diversity surveillance. *Trends Mol Med* 2012;18:691-4.
9. Compton AA, Malik HS, Emerman M. Host gene evolution traces the evolutionary history of ancient primate lentiviruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013;368:20120496.
10. Vallari A, Holzmayer V, Harris B, et al. Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *J Virol* 2010;85:1403-7.
11. Vidal N, Peeters M, Mulanga-Kabeya C, et al. Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J Virol* 2000;74:10498-507.
12. Berry N, Davis C, Jenkins A, et al. Phylogeny and the origin of HIV-1. *Nature* 2001;410:1047-8.
13. Delaugerre C, De Oliveira F, Lascoux-Combe C, et al. HIV-1 group N: travelling beyond Cameroon. *Lancet* 2011;378:1894.
14. Abongwa LE, Nyamache AK, Torimiro JN, et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtypes in the northwest region, Cameroon. *Virology Journal* 2019;16:103.
15. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, et al. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 2006;20:W13-23.
16. Lihana RW, Ssemwanga D, Abimiku A, et al. Update on HIV-1 diversity in Africa: a decade in review. *AIDS Rev* 2012;14:83-100.
17. Taylor BS, Hammer SM, McCutchan FE. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med* 2008;359:1965-6.
18. Renjifo B, Gilbert P, Chaplin B, et al. Preferential in-utero transmission of HIV-1 subtype C as compared to HIV-1 subtype A or D. *AIDS* 2004;18:1629-36.
19. Casseb J, Komninakis S, Abdalla L, et al. HIV disease progression: is the Brazilian variant subtype B' (GWFR motif) less pathogenic than US/European subtype B (GPGR)? *Int J Infect Dis* 2002;6:164-9.
20. Kaleebu P, French N, Mahe C, et al. Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1-positive persons in Uganda. *J Infect Dis* 2002;185:1244-50.
21. Baeten JM, Chohan B, Lavreys L, et al. HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads. *J Infect Dis* 2007;195:1177-80.
22. Camacho RJ, Vandamme A-M. Antiretroviral resistance in different HIV-1 subtypes: impact on therapy outcomes and resistance testing interpretation. *Curr Opin HIV AIDS* 2007;2:123-9.
23. Abecasis AB, Wensing AMJ, Paraskevis D, et al. HIV-1 subtype distribution and its demographic determinants in newly diagnosed patients in Europe suggest highly compartmentalized epidemics. *Retrovirology* 2013;10:7.
24. Junqueira DM, de Matos Almeida SE. HIV-1 subtype B: Traces of a pandemic. *Virology* 2016;495:173-84.

25. Santos AFA, Lengrubler RB, Soares EA, et al. Conservation patterns of HIV-1 RT connection and RNase H domains: identification of new mutations in NRTI-treated patients. *PLoS One* 2008;3:e1781.
26. Pinto ME, Schrago CG, Miranda AB, et al. A molecular study on the evolution of a subtype B variant frequently found in Brazil. *Genet Mol Res* 2008;7:1031-44.
27. Ou CY, Takebe Y, Weniger BG, et al. Independent introduction of two major HIV-1 genotypes into distinct high-risk populations in Thailand. *Lancet* 1993;341:1171-4.
28. Cleghorn FR, Jack N, Carr JK. A distinctive clade B HIV type 1 is heterosexually transmitted in Trinidad and Tobago. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10532-7.
29. Kim EY, Cho YS, Maeng SH, et al. Characterization of V3 loop sequences from HIV type 1 subtype B in South Korea: predominance of the GPGS motif. *AIDS Res Hum Retrovir* 1999;15:681-6.
30. Rodgers MA, Vallari AS, Harris B, et al. Identification of rare HIV-1 Group N, HBV AE, and HTLV-3 strains in rural South Cameroon. *Virology* 2017;504:141-51.
31. Lau KA, Wong JLL. Current trends of HIV recombination worldwide. *Infect Dis Rep* 2013;5:e4.
32. Von Wyl V, Kouyos RD, Yerly S, et al. The role of migration and domestic transmission in the spread of HIV-1 non-B subtypes in Switzerland. *J Infect Dis* 2011;204:1095-103.
33. Anne-Geneviève M, Santoro M, Charpentier C, et al. Epidemiological study of Doravirine associated resistance mutations in HIV-1 infected treatment-naïve patients from two large databases in France and Italy. 15th EU Meeting on HIV & Hepatitis 2017.
34. Li Y, Han Y, Xie J, et al. CRF01_AE subtype is associated with X4 tropism and fast HIV progression in Chinese patients infected through sexual transmission. *AIDS Lond Engl* 2014;28:521-30.
35. Liebert MA, Casado C, Urtasun I, et al. Different distribution of HIV type 1 genetic variants in European patients with distinct risk practices. *AIDS Res Hum Retrovir* 2000;16:299-304.
36. European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. HIV/AIDS surveillance in Europe 2019 – 2018 data. Stockholm: ECDC; 2019.
37. Delgado E, Benito S, Montero V, et al. Diverse large HIV-1 non-subtype B clusters are spreading among men who have sex with men in Spain. *Front Microbiol* 2019;10:655.
38. Perelson AD, Neumann AU, Markowitz M, et al. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996;271:1582-6.
39. GESIDA. Documento de consenso de GeSIDA/Plan Nacional sobre el SIDA respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el VIH. Actualización enero 2019.
40. Jiang X, Feyertag F, Meehan CJ, et al. Characterizing the diverse mutational pathways associated with R5-Tropic Maraviroc resistance: HIV-1 that uses the drug-bound CCR5 Coreceptor. *J Virol* 2015;89:11457-72.
41. infoSIDA. Departamento de Salud y Servicios Humanos EEUU. Disponible en: <https://infosida.nih.gov/drugs/511/ibalizumab-uyk/0/patient>
42. García F, Álvarez M, Bernal C, et al. 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(4):297-307.
43. Aguilera A, Álvarez M, García F, et al. Diagnóstico microbiológico de la infección por el VIH. 6a. Procedimientos en Microbiología Clínica. SEIMC 2014.
44. Briggs DR, Tuttle DL, Sleasman JW, et al. Envelope V3 amino acid sequence predicts HIV-1 phenotype (co-receptor usage and tropism for macrophages). *AIDS Lond Engl* 2000;14:2937-9.
45. Mörner A, Björndal A, Albert Jan, et al. Primary Human Immunodeficiency Virus type 2 (HIV-2) isolates, like HIV-1 isolates, frequently use CCR5 but show promiscuity in coreceptor usage. *J Virol* 1999;73:2343-9.
46. Edwards S, Stucki H, Bader J, et al. A diagnostic HIV-1 tropism system based on sequence relatedness. *J Clin Microbiol* 2015;53:597-610.
47. Raymond S, Delobel P, Rogez S, et al. Genotypic prediction of HIV-1 CRF01_AE tropism. *J Clin Microbiol* 2013;51:564-70.
48. Low AJ, Swenson LC, Harrigan PR. HIV coreceptor phenotyping in the clinical setting. *AIDS Rev* 2008;10:143-51.
49. Riemenschneider M, Cashin KY, Budeus B, et al. Genotypic prediction of co-receptor tropism of HIV-1 subtypes A and C. *Sci Rep* 2016;6:24883.
50. Sánchez V, Robledano C, Lumberras B, et al. A highly sensitive and specific model for predicting HIV-1 tropism in treatment experienced patients combining V3 loop sequences interpretation and clinical parameters. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections 2010 (Abstract 543).
51. Lengauer T, Sander O, Sierra S, et al. Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage. *Nat Biotechnol* 2007;25:1407-10.
52. Siddik AB, Haas A, Rahman MS, et al. Phenotypic co-receptor tropism and Maraviroc sensitivity in HIV-1 subtype C from East Africa. *Sci Rep* 2018;8:2363.
53. Cashin K, Gray LR, Harvey KL, et al. Reliable genotypic tropism tests for the major HIV-1 subtypes. *Sci Rep* 2015;5:8543.
54. Gupta S, Neogi U, Srinivasa H, et al. HIV-1 coreceptor tropism in India: increasing proportion of X4-tropism in subtype C strains-over two decades. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2014;65:397-404.
55. Matsuda M, Louvel S, Sugiura W, et al. Performance evaluation of a genotypic tropism test using HIV-1 CRF01_AE isolates in Japan. *Jpn J Infect Dis* 2018;71(4):264-6.
56. Kalu AW, Telele NF, Gebreselasie S, et al. Monophylogenetic HIV-1C epidemic in Ethiopia is dominated by CCR5-tropic viruses-an analysis of a prospective country-wide cohort. *BMC Infect Dis* 2017;17:37.
57. Amogne W, Bontell I, Grossman S, et al. Phylogenetic Analysis of Ethiopian HIV-1 subtype C near full-length genomes reveals high intrasubtype diversity and a strong geographical cluster. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2016;32:471-4.
58. Garcia-Perez J, Staropoli I, Azoulay S, et al. A single-residue change in the HIV-1 V3 loop associated with maraviroc resistance impairs CCR5 binding affinity while increasing replicative capacity. *Retrovirology* 2015;12:50.
59. Wensing AM, Calvez V, Günthard HF, et al. 2014 Update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top Antivir Med* 2014;22:642-50.
60. Döring M, Büch J, Friedrich G, et al. geno2pheno[ngs-freq]: a genotypic interpretation system for identifying viral drug resistance using next-generation sequencing data. *Nucleic Acids Research* 2018;46:271-7.