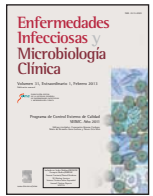




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Detección de mutaciones de resistencia en ADN proviral en infección por VIH-1

Rafael Delgado

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España

RESUMEN

Palabras clave:

VIH-1
Sida
Provirus
Análisis de secuencias
Mutaciones
Agentes antirretrovirales

El análisis del ADN proviral en la infección por VIH puede tener interesantes aplicaciones si se utilizan herramientas lo suficientemente sensibles para detectar variantes minoritarias, como la secuenciación de genomas individuales (SGI). Esta tecnología, realizada a partir de ADN de sangre total, permite una determinación más precisa del tropismo y la detección de mutaciones de resistencias (MR) circulantes y también MR archivadas no detectables en plasma. Muchas de estas MR tienen gran relevancia clínica y su detección podría ser muy útil en situaciones específicas, como el comienzo de la terapia antirretroviral para excluir la transmisión de cepas con MR, como información previa al considerar estrategias de simplificación en pacientes con carga viral indetectable, o en la planificación de tratamiento antirretroviral en pacientes previamente tratados y con limitada disponibilidad de informes clínicos. El análisis clonal mediante SGI ha permitido obtener información importante en patogenia y diagnóstico; sin embargo, en su diseño actual es poco adecuada para el laboratorio clínico. La tecnología de secuenciación de nueva generación que permite el análisis simultáneo de un número considerable de secuencias se ha comenzado a aplicar al análisis de la diversidad de VIH-1 en plasma. La aplicación al análisis del reservorio celular de VIH-1, mediante estas técnicas con alta sensibilidad y en formatos automatizados, permitirá disponer de todo el registro de variantes acontecidas durante la evolución de la enfermedad, una información seguramente muy útil para el manejo clínico individual y poblacional de la infección por VIH-1.

© 2012 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Detection of resistance mutations in proviral DNA in HIV-1 infection

ABSTRACT

Keywords:

HIV-1
AIDS
Provirus
Sequencing analysis
Mutations
Antiretroviral agents

Analysis of proviral DNA in HIV infection may have useful applications if techniques that are sufficiently sensitive to detect minor variants, such as single genome sequencing (SGS), are used. This technology, which is performed in DNA from whole blood, improves determination of co-receptor tropism and the detection of both circulating and archived resistance mutations (RM) that are undetectable in plasma. Many of these RM have clinical relevance and their identification could be useful in specific situations, such as the start of antiretroviral therapy to exclude the transmission of resistant strains, as information to be weighed in simplification strategies in patients with undetectable viral loads, and in antiretroviral-experienced patients with limited availability of clinical reports. Clonal analysis using SGS has yielded useful information on the pathogenesis and diagnosis of HIV-1 infection but, in its current design, is inappropriate for the clinical laboratory. The new generation of sequencing technology, which allows the simultaneous analysis of a large number of sequences, has begun to be applied in the analysis of the diversity of plasma HIV-1. The use of these highly sensitive, automated techniques in the analysis of HIV-1 cellular reservoirs will potentially allow all variants recorded during the history of the disease to become available. This information would be highly useful for the clinical management of HIV-1 infection at the individual and population level.

© 2012 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Latencia y reservorio del VIH-1

Durante su proceso de infección el virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) infecta preferentemente linfocitos T CD4+ memoria¹ y se integra en su genoma en forma de ADN proviral². La mayoría de las células infectadas muere en un plazo de 24 h como consecuencia de la replicación del virus; sin embargo, un pequeño número de linfocitos T CD4+ infectados^{3,4} revierte a la situación de reposo celular para constituir un reservorio latente de larga duración⁴⁻⁸ (fig. 1).

Este reservorio latente de VIH-1 se mantiene relativamente estable, sin una reducción significativa a lo largo de años, incluso en pacientes en tratamiento antirretroviral (TAR) supresor^{3,5-8}. Todas las variantes de VIH-1 circulantes que se han producido durante la infección están potencialmente representadas en el reservorio latente celular como provirus⁵⁻⁹.

Cuando se hace referencia al reservorio de células latentemente infectadas por VIH-1, en realidad se está hablando de un pequeño número de linfocitos T circulantes CD4+ memoria, unos pocos millones, que se encuentran en reposo celular¹⁰. También es posible la existencia de otros reservorios en tejido linfático u otras poblaciones celulares, como la recientemente descrita en células hematopoyéticas que pueden infectarse latentemente con VIH-1^{11,12}. Estos reservorios alternativos son más difíciles de estudiar y su existencia no está completamente aceptada^{13,14}.

Es clave comprender cómo se establece y mantiene el reservorio de células latentemente infectadas. Principalmente son 3 los mecanismos que podrían estar implicados:

- Vida media de las células latentemente infectadas muy prolongada¹⁵.
- Replicación de bajo nivel^{16,17}.
- Proliferación de células latentemente infectadas¹⁸.

Estos 3 mecanismos no son completamente excluyentes y aclarar su participación en el establecimiento de la latencia del VIH-1 es muy importante para entender la patogenia, valorar las alternativas terapéuticas y diseñar posibles estrategias de erradicación¹⁹. En este sentido, las técnicas de cuantificación del ADN proviral de VIH-1 podrían informar del tamaño del reservorio y su evolución; sin embargo, la utilidad de la "carga proviral" es de momento cuestionable por 2 motivos: actualmente, no hay técnicas estandarizadas para su realización y los resultados obtenidos en diferentes laboratorios no son

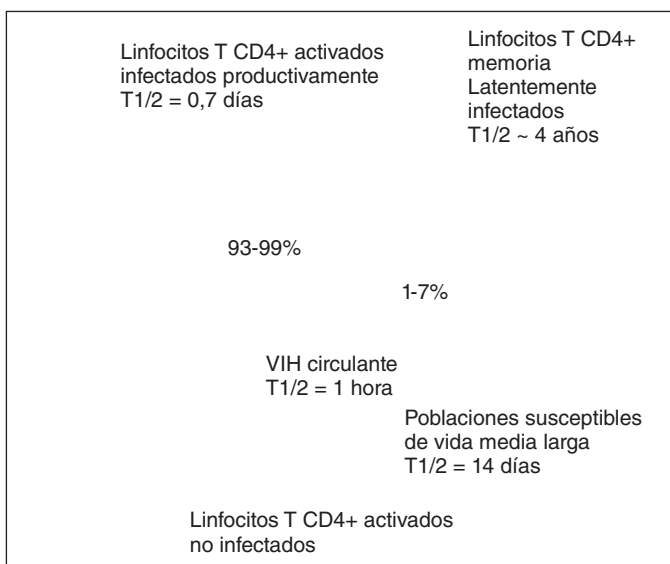


Figura 1. Dinámica de la replicación y latencia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1).

siempre comparables^{20,21} y, más importante, no se ha establecido una asociación clara de la carga proviral con una situación clínica específica, de tal forma que su valor pronóstico se encuentra en evaluación²²⁻²⁴.

Secuenciación y diversidad en infección por VIH-1

Hay algunas limitaciones para el estudio detallado de este fenómeno: por una parte, la baja proporción de células infectadas y partículas circulantes en los pacientes en TAR, por otra, la baja sensibilidad de las técnicas convencionales de secuenciación poblacional (SP) que informan de la secuencia promedio de toda la población de virus y solo detectan cambios presentes al menos en un 20-30% de las secuencias²⁵. Esta baja sensibilidad de las técnicas de genotipado poblacional tiene una limitación añadida, ya que la secuencia promedio tampoco permite establecer la asociación de todas las mutaciones detectadas en un mismo genoma. Recientemente se han puesto a punto tecnologías como la secuenciación de genomas individuales (SGI), que consiste en la dilución de la muestra original de tal forma que la amplificación (PCR) y posterior secuenciación se realiza a partir de un solo genoma de virus, evitando así los sesgos de amplificación y los artefactos de recombinación durante el propio proceso de PCR. Esto se consigue cuantificando la carga de la muestra y estimando la dilución a partir de la cual solo el 30% de las reacciones son positivas (80% de probabilidad de copia de partida única por muestra, según distribución de Poisson) (fig. 2).

En otras alternativas de análisis clonal que han sido ampliamente utilizadas, como el clonaje de productos de PCR seguido de transformación bacteriana y secuenciación, está demostrado que los resultados se artefactan considerablemente por sesgos de muestreo²⁶ y por introducción de recombinaciones durante la fase de amplificación poblacional²⁷. El análisis de clones individuales se considera cada vez más importante para el estudio de las complejas muestras poblacionales de la infección por VIH-1 y otros virus, de tal forma que en el área de la biotecnología algunas compañías están comenzando a proponer plataformas diseñadas exclusivamente para este objetivo²⁸. Mediante SGI podemos aumentar la sensibilidad de detección de mutaciones minoritarias y, al disponer de secuencias completas independientes, establecer nítidamente su asociación, realizar estudios

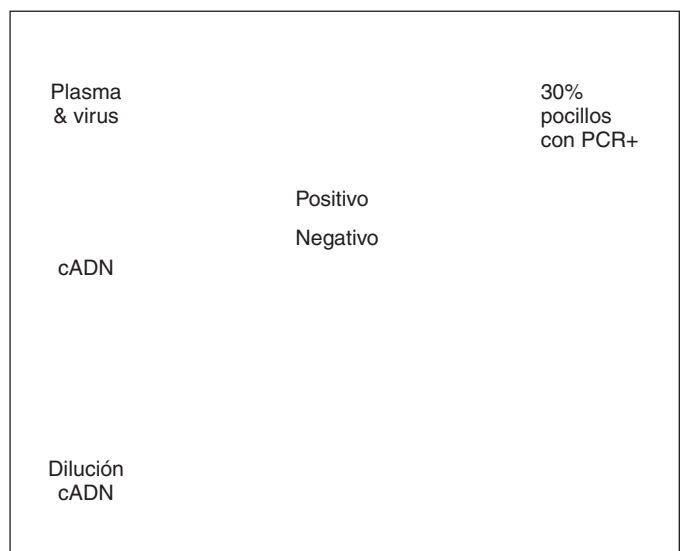


Figura 2. Esquema general del procedimiento de secuenciación de genomas individuales (SGI): la muestra de partida, ADN o cADN, es diluida hasta que solo el 30% de las amplificaciones son positivas. Las amplificaciones en los pocillos positivos provienen, con alta probabilidad, de secuencias únicas y son secuenciadas individualmente. El resultado debe consistir en una secuencia pura, sin ambigüedades en ninguna posición. PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

filogenéticos más completos, estudiar la evolución en el tiempo de las diferentes poblaciones e incluso detectar fenómenos de recombinación o superinfección²⁹.

Secuenciación de VIH-1 proviral

Los linfocitos T CD4+ de sangre periférica son una diana de gran interés para analizar el curso de la selección de las diferentes variantes virales, detectar las mutaciones de resistencia (MR) preexistentes o inducidas por fármacos antirretrovirales que pueden ser relevantes para diseñar el tratamiento de rescate. Sin embargo, los intentos de utilizar las secuencias del virus asociado a células para el manejo clínico no han sido satisfactorios, debido principalmente a una falta de sensibilidad para identificar las variantes virales con frecuencias inferiores al 20-30%^{27,30}. Las ventajas del ADN proviral para los estudios de resistencia serían múltiples (tabla 1). Por una parte sabemos que alberga todas las posibles variantes del virus acontecidas durante la evolución de la enfermedad, es la única forma de obtener información del virus cuando la replicación está suprimida por el TAR y, desde un punto de vista práctico, es una muestra estable, fácil de obtener y que puede ser adaptada a formatos como las muestras de sangre transportadas en papel de filtro que no requieren refrigeración³¹⁻³³. Una posible limitación de los análisis de ADN proviral es la proporción relativamente baja de linfocitos T CD4+ infectados por el VIH-1. Nuestra estimación propia y la de otros³⁴ es que la infección se produce dentro de una gama de 1/400-800 CD4+ células T circulantes, que razonablemente permite el análisis clonal en la mayoría de las muestras clínicas (tabla 1).

Se han desarrollado ensayos moleculares más sensibles que la SP para identificar variantes minoritarias, incluyendo métodos como PCR alelo-específica^{35,36}, ensayo de oligonucleótido-ligasa (OLA)³⁷, LigAMP³⁸, pirosecuenciación^{39,40} y la mencionada SGI o análisis de resistencia clonal (ARC). La SGI/ARC es una técnica laboriosa, pero muy informativa, que se ha aplicado con éxito a la patogénesis del VIH-1 y la detección de MR^{25,41-43}, permite el análisis individual de los clones virales, la homología de su secuencia y el análisis evolutivo y, muy importante, permite establecer de forma inequívoca la combinación de varias MR en el mismo genoma viral.

Recientemente hemos aplicado la tecnología de SGI/ARC al análisis del ADN de VIH-1 asociado a células con 2 objetivos: determinación del tropismo genotípico de VIH-1 y detección de MR circulantes y archivadas no circulantes.

Determinación genotípica del tropismo de VIH-1 en ADN proviral

Las pruebas genotípicas para la determinación del tropismo celular de VIH-1, R5 o X4 se han constituido en una alternativa diagnóstica clara a las pruebas fenotípicas⁴⁴ en situaciones clínicas donde se considera la administración de antagonistas de CCR5⁴⁵⁻⁴⁷ como parte del TAR. La determinación genotípica del tropismo está basada en la secuenciación de la región V3 de Env y su posterior análisis por alguna de las herramientas informáticas disponibles *online* (Geno2Pheno⁴⁸, PSSM⁴⁹). La determinación del tropismo se realiza típicamente en plasma y requiere muestras con una carga viral (CV) > 500-1.000 copias/ml de plasma, por lo que no es útil en un número creciente de casos con CV baja o indetectable.

En un estudio llevado a cabo en nuestro laboratorio⁵⁰ hemos comparado los resultados obtenidos mediante la técnica fenotípica de determinación de tropismo de referencia (*Enhanced Sensitivity Trofile Assay* [ESTA]⁵¹) con el análisis genotípico del ADN de VIH-1 obtenido de células de sangre periférica. El análisis genotípico se realizó por SP y por el análisis del genoma individual (SGI/ARC) del VIH-1 en las secuencias de ADN proviral. Se estudiaron 41 pacientes infectados por VIH-1 testados por ESTA en los últimos 6 meses antes del análisis genotípico. Para la predicción del tropismo se utilizó el algoritmo

Tabla 1

Ventajas y desventajas de la utilización del ADN proviral del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) en estudios diagnósticos

ADN proviral en infección por VIH: utilidad diagnóstica	
Ventajas	Desventajas
Muestra estable, fácil transporte y almacenamiento	Baja proporción de células infectadas
Archivo histórico de variantes	Archivo de secuencias defectivas
Permite estudios evolutivos individuales	Dinámica de establecimiento y mantenimiento del reservorio desconocida en parte
Única diana si CV indetectable en plasma	Cuantificación de carga proviral no estandarizada y valor pronóstico incierto
Diana para estudios de erradicación	

CV: carga viral.

Geno2Pheno⁴⁸ con un nivel de falsos positivos del 5,75%. Por SGI/ARC se analizó un promedio de 11 clones por muestra y la muestra se consideró como X4 al detectar > 10% de clones X4. La sensibilidad (SE), especificidad (ES) y valor predictivo positivo (VPP) para la detección de cepas X4 por SP de ADN proviral en comparación con el ESTA fueron el 41,2, el 100 y el 100%, respectivamente. Mediante SGI/ARC, la sensibilidad para la detección de secuencias X4 aumentó considerablemente: SE, ES y VPP fueron el 76,5, el 87,5 y el 81,3%, respectivamente. Nuestros resultados sugieren que en el campo específico del uso de correceptor, analizando un número relativamente pequeño de clones celulares de VIH-1, la SE del procedimiento aumenta significativamente en comparación con la prueba de referencia fenotípica en muestras de plasma. La principal ventaja de utilizar ADN proviral para la prueba de tropismo del VIH-1 en la clínica sería la posibilidad de estudiar a los pacientes no virémicos que se consideran para el cambio o simplificación del TAR. Nuestros resultados demuestran que una sola determinación de tropismo genotípico por SP de ADN proviral no es lo suficientemente sensible para detectar pacientes con frecuencia baja de virus con tropismo X4 que son clínicamente relevantes. Este estudio apoya, como prueba de concepto, la utilización del ADN proviral para la determinación del tropismo utilizando técnicas sensibles. La utilidad del análisis proviral para la determinación genotípica del tropismo ha sido igualmente corroborada en otros estudios^{52,53}.

Detección de mutaciones de resistencia en ADN proviral

Una limitación conocida de las pruebas de susceptibilidad a antirretrovirales por métodos genotípicos o fenotípicos es la falta de fiabilidad de estas en la detección de variantes minoritarias de VIH-1 en la población del virus infectante. Esta limitación es particularmente importante en pacientes con antecedentes de tratamientos complejos y que han suspendido uno o más fármacos antirretrovirales. En algunos pacientes, la historia del tratamiento puede ser utilizada para inferir la presencia de mutaciones archivadas. Por ejemplo, si un paciente ha recibido lamivudina (3TC) como parte de un régimen de tratamiento y este no ha sido completamente supresor, es muy probable que exista la mutación M184V dentro de la población del virus de ese paciente, incluso si no se detecta en el momento de realizar el estudio de resistencias convencional en plasma (SP). El mismo principio se puede aplicar a los pacientes que recibieron efavirenz o nevirapina como parte de un régimen de tratamiento con supresión incompleta^{54,55}. Estas variantes pueden persistir a concentraciones bajas en las células latentemente infectadas, incluso durante un régimen de tratamiento posterior que sí consiga la supresión completa de la replicación del virus⁵⁴. Con el objetivo de comprobar la utilidad

de la secuenciación sensible para la detección de mutaciones de resistencia circulantes y no circulantes (archivadas) en ADN proviral hemos realizado un estudio en 12 pacientes TAR en seguimiento en nuestra unidad⁵⁶; de ellos 7 eran virémicos y 5 con CV < 50 copias/ml en el momento del estudio. Todos los pacientes tenían MR documentadas a lo largo del seguimiento y que habían desaparecido de la circulación por cambios en el tratamiento.

Después de la extracción de ADN de células de sangre periférica, se analizó por SGI/ACR un promedio de 20 clones de VIH-1 celular por muestra. En los 7 pacientes con viremia en el momento de la prueba se detectó un total de 26 MR en plasma por secuenciación convencional (SP). Todas las 26 MR circulantes identificadas por SP fueron detectadas por SGI/CRA de ADN celular. En los 12 pacientes estudiados se identificó un total de 59 MR, que desaparecieron posteriormente por cambios en el tratamiento. El análisis de SGI/ACR detectó 32 (54%) de estas MR archivadas, algunas de ellas no detectadas por períodos de 8-9 años. Adicionalmente, la SGI/ARC detectó 15 MR que nunca se habían detectado en plasma en 7 de los 12 pacientes.

Hasta el momento, la correlación encontrada por diferentes estudios en los resultados obtenidos por SP a partir de plasma y sangre ha sido relativamente alta para la detección de MR circulantes en pacientes no tratados^{31,57}. Una situación diferente se ha descrito en pacientes con fracaso terapéutico en los que, en general, se detectan más MR en plasma que en sangre⁵⁸. En nuestro estudio, en el grupo de MR circulantes la frecuencia clonal media por SGI/ACR en ADN celular fue del 80%, mientras que la frecuencia clonal media de las MR no circulantes/archivadas fue mucho menor, 8%, lo que explica el bajo rendimiento para la detección de MR archivadas encontradas en algunos estudios por SP^{59,60} de ADN proviral.

La detección sensible de mutaciones implica el riesgo de introducir errores durante el proceso de amplificación y secuenciación genética. La tasa de error de la totalidad del procedimiento SGI/ACR se estimó en nuestro laboratorio mediante el análisis del clon molecular de VIH-1 NL4-3 y fue 4×10^{-5} , lo que hace muy poco probable la ocurrencia de un error en los codones asociados a MR. Por otra parte, la mayoría de las MR detectadas estuvo presente en más de un clon o estaba vinculada a otra MR, lo que apoya su significación. La SE de nuestro análisis (media de 20 clones por muestra) es limitada y, aunque hemos sido capaces de detectar algunas MR representadas en el 4% de los clones, el límite del 95% inferior de detección de MR osciló entre el 14-34%. Con este nivel de SE ha sido posible detectar el 100% de las MR circulantes (la mayor parte de VIH-1 detectado en el ADN celular en los pacientes virémicos presumiblemente consiste en formas circulares no-integradas asociadas a infección reciente y que se caracterizan por ser inestables y transitorias^{61,62}) y el 54% de las MR no circulantes que habían sido previamente informadas por SP en plasma así como MR no conocidas en 7 de los 12 pacientes, muchas de ellas con un claro impacto en el perfil de susceptibilidad antirretroviral⁵⁶. Nuestras estimaciones basadas en la distribución de frecuencia de los clones detectados por SGI/ARC indican que la secuenciación de 50-100 clones por muestras podría detectar el 90-95% de toda la historia de MR de un paciente. Aunque este nivel de análisis es difícilmente alcanzable por SGI/ARC, sí sería susceptible de ser adaptado a un formato automatizado en el futuro cercano.

En resumen, hemos demostrado que la SGI/ACR del VIH-1 celular a partir de ADN de sangre total permite la detección de todas las MR circulantes y una proporción significativa de MR archivadas no detectables en plasma. Muchas de estas MR tienen gran relevancia clínica y su detección podría ser muy útil en situaciones específicas, como el comienzo de la terapia antirretroviral para excluir la transmisión de MR, como información previa al considerar estrategias de simplificación en pacientes con CV < 50 cp/ml, o en la planificación de TAR en pacientes previamente tratados y con limitada disponibilidad de informes clínicos. La sangre entera proporciona una ventaja, ya que puede ser almacenada a -20°C durante períodos prolongados, con manipulaciones mínimas en comparación con las células

mononucleares y, por lo tanto, más fácil de usar en ensayos clínicos y práctica de rutina. Finalmente, la cuantificación de las frecuencias clonales en nuestro estudio permite una mejor comprensión de la dinámica de la representación MR en el reservorio celular a lo largo del tiempo y puede ser la base para el diseño de las nuevas estrategias de tratamiento.

El análisis clonal mediante SGI/ACR es una técnica robusta que ha permitido obtener información de extraordinario valor en patogenia^{29,42,43} y diagnóstico^{25,41} de la infección por VIH-1; sin embargo, en su diseño actual es poco adecuada para el laboratorio clínico. La tecnología de secuenciación de nueva generación que permite la secuenciación en paralelo y el análisis simultáneo de un número considerable de secuencias^{63,64} está suponiendo un extraordinario avance en todos los campos relacionados con la genética. Es previsible que en el futuro cercano se desarrollen nuevas aplicaciones de esta tecnología que se ha comenzado a aplicar al análisis de la diversidad de VIH-1 en plasma con interesantes resultados^{40,65,66}. Aunque de momento las técnicas de secuenciación de nueva generación se encuentran en una fase muy inicial de implantación en el laboratorio clínico, la aplicación al análisis del reservorio celular de VIH-1, mediante estas técnicas con alta sensibilidad y en formatos automatizados, permitirá disponer de todo el registro de variantes acontecidas durante la evolución de la enfermedad, una información seguramente muy útil para el manejo clínico individual y poblacional de la infección por VIH-1.

Agradecimientos

La investigación ha sido financiada por el ISCIII (FIS PI1101580 y RD12/0017) y FIPSE (36749).

Conflicto de intereses

El autor declara no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature*. 2002;417:95-8.
2. Temin HM. The DNA provirus hypothesis. *Science*. 1976;192:1075-80.
3. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*. 1997;278:1295-300.
4. Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*. 1997;387:183-8.
5. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med*. 1999;5:512-7.
6. Blankson JN, Persaud D, Siliciano RF. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med*. 2002;53:557-93.
7. Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:13193-7.
8. Wong JK, Hezareh M, Gunthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA, et al. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science*. 1997;278:1291-5.
9. Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, Fauci AS. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:8869-73.
10. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:251-62.
11. Carter CC, Onafuwa-Nuga A, McNamara LA, Riddell J 4th, Bixby D, Savona MR, et al. HIV-1 infects multipotent progenitor cells causing cell death and establishing latent cellular reservoirs. *Nat Med*. 2010;16:446-51.
12. McNamara LA, Ganesh JA, Collins KL. Latent HIV-1 infection occurs in multiple subsets of hematopoietic progenitor cells and is reversed by NF-kappaB activation. *J Virol*. 2012;86:9337-50.
13. Josefsson L, Eriksson S, Sinclair E, Ho T, Killian M, Epling L, et al. Hematopoietic precursor cells isolated from patients on long-term suppressive HIV therapy did not contain HIV-1 DNA. *J Infect Dis*. 2012;206:28-34.
14. Durand CM, Ghaur G, Siliciano JD, Rabi SA, Eisele EE, Salgado M, et al. HIV-1 DNA is detected in bone marrow populations containing CD4+ T cells but is not found in purified CD34+ hematopoietic progenitor cells in most patients on antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2012;205:1014-8.

15. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med.* 2003;9:727-8.
16. Tobin NH, Learn GH, Holte SE, Wang Y, Melvin AJ, McKernan JL, et al. Evidence that low-level viremia during effective highly active antiretroviral therapy result from two processes: expression of archival virus and replication of virus. *J Virol.* 2005;79:9625-34.
17. Sharkey M, Babic DZ, Greenough T, Gulick R, Kuritzkes DR, Stevenson M. Episomal viral cDNAs identify a reservoir that fuels viral rebound after treatment interruption and that contributes to treatment failure. *PLoS Pathog.* 2011;7:e1001303.
18. Bull ME, Learn GH, McElhone S, Hitti J, Lockhart D, Holte S, et al. Monotypic human immunodeficiency virus type 1 genotypes across the uterine cervix and in blood suggest proliferation of cells with provirus. *J Virol.* 2009;83:6020-8.
19. Richman DD, Margolis DM, Delaney M, Greene WC, Hazuda D, Pomerantz RJ. The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science.* 2009;323:1304-7.
20. De Rossi A, Zanchetta M, Vitone F, Antonelli G, Bagnarelli P, Buonaguro L, et al. Quantitative HIV-1 proviral DNA detection: a multicentre analysis. *New Microbiol.* 2010;33:293-302.
21. Lillo FB, Grasso MA, Lodini S, Bellotti MG, Colucci G. Few modifications of the Cobas Amplicor HIV Monitor 1.5 test allow reliable quantitation of HIV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol Methods.* 2004;120:201-5.
22. Gianella S, Von Wyl V, Fischer M, Niederost B, Battagay M, Bernasconi E, et al. Effect of early antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection on cell-associated HIV-1 DNA and plasma HIV-1 RNA. *Antivir Ther.* 2011;16:535-45.
23. Kominakis SV, Santos DE, Santos C, Oliveros MP, Sanabani S, Diaz RS. HIV-1 proviral DNA loads (as determined by quantitative PCR) in patients subjected to structured treatment interruption after antiretroviral therapy failure. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2132-3.
24. Chege D, Kovacs C, La Porte C, Ostrowski M, Raboud J, Su D, et al. Effect of raltegravir intensification on HIV proviral DNA in the blood and gut mucosa of men on long-term therapy: a randomized controlled trial. *AIDS.* 2012;26:167-74.
25. Palmer S, Kearney M, Maldarelli F, Halvas EK, Bixby CJ, Bazmi H, et al. Multiple, linked human immunodeficiency virus type 1 drug resistance mutations in treatment-experienced patients are missed by standard genotype analysis. *J Clin Microbiol.* 2005;43:406-13.
26. Liu SL, Rodrigo AG, Shankarappa R, Learn GH, Hsu L, Davidov O, et al. HIV quaspecies and resampling. *Science.* 1996;273:415-6.
27. Halvas EK, Aldrovandi GM, Balfe P, Beck IA, Boltz VF, Coffin JM, et al. Blinded, multicenter comparison of methods to detect a drug-resistant mutant of human immunodeficiency virus type 1 at low frequency. *J Clin Microbiol.* 2006;44:2612-4.
28. Harris TD, Buzby PR, Babcock H, Beer E, Bowers J, Braslavsky I, et al. Single-molecule DNA sequencing of a viral genome. *Science.* 2008;320:106-9.
29. Salazar-González JF, Bailes E, Pham KT, Salazar MG, Guffey MB, Keele BF, et al. Deciphering human immunodeficiency virus type 1 transmission and early envelope diversification by single-genome amplification and sequencing. *J Virol.* 2008;82:3952-70.
30. Department of Health and Human Services. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents. 2012 [consultado 14-11-2012]. Disponible en: <http://www.aidsinfo.nih.gov/guidelines/html/1/adult-and-adolescent-treatment-guidelines/0/>
31. McNulty A, Jennings C, Bennett D, Fitzgibbon J, Bremer JW, Ussery M, et al. Evaluation of dried blood spots for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance testing. *J Clin Microbiol.* 2007;45:517-21.
32. Steegen K, Luchters S, Demecheleer E, Dauwe K, Mandaliya K, Jaoko W, et al. Feasibility of detecting human immunodeficiency virus type 1 drug resistance in DNA extracted from whole blood or dried blood spots. *J Clin Microbiol.* 2007;45:3342-51.
33. Ziemniak C, Mengistu Y, Ruff A, Chen YH, Khaki L, Bedri A, et al. Use of dried-blood-spot samples and in-house assays to identify antiretroviral drug resistance in HIV-infected children in resource-constrained settings. *J Clin Microbiol.* 2011;49:4077-82.
34. Josefsson L, King MS, Makitalo B, Brännström J, Shao W, Maldarelli F, et al. Majority of CD4+ T cells from peripheral blood of HIV-1-infected individuals contain only one HIV DNA molecule. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108:11199-204.
35. Palmer S, Boltz V, Martinson N, Maldarelli F, Gray G, McIntyre J, et al. Persistence of nevirapine-resistant HIV-1 in women after single-dose nevirapine therapy for prevention of maternal-to-fetal HIV-1 transmission. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:7094-9.
36. Johnson JA, Li JF, Wei X, Lipscomb J, Bennett D, Brant A, et al. Simple PCR assays improve the sensitivity of HIV-1 subtype B drug resistance testing and allow linking of resistance mutations. *PLoS One.* 2007;2:e638.
37. Villahermosa ML, Beck I, Pérez-Álvarez L, Contreras G, Frenkel LM, Osmanov S, et al. Detection and quantification of multiple drug resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase by an oligonucleotide ligation assay. *J Hum Virol.* 2001;4:238-48.
38. Shi C, Eshleman SH, Jones D, Fukushima N, Hua L, Parker AR, et al. LigAmp for sensitive detection of single-nucleotide differences. *Nat Methods.* 2004;1:141-7.
39. D'Aquila RT, Geretti AM, Horton JH, Rouse E, Kheshti A, Raffanti S, et al. Tenofovir (TDF)-selected or abacavir (ABC)-selected low-frequency HIV type 1 subpopulations during failure with persistent viremia as detected by ultradeep pyrosequencing. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2011;27:201-9.
40. Codoner FM, Pou C, Thielen A, García F, Delgado R, Dalmau D, et al. Added value of deep sequencing relative to population sequencing in heavily pre-treated HIV-1-infected subjects. *PLoS One.* 2011;6:e19461.
41. McKinnon JE, Delgado R, Pulido F, Shao W, Arribas JR, Mellors JW. Single genome sequencing of HIV-1 gag and protease resistance mutations at virologic failure during the OK04 trial of simplified versus standard maintenance therapy. *Antivir Ther.* 2011;16:725-32.
42. Salazar-González JF, Salazar MG, Keele BF, Learn GH, Giorgi EE, Li H, et al. Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection. *J Exp Med.* 2009;206:1273-89.
43. Keele BF, Giorgi EE, Salazar-González JF, Decker JM, Pham KT, Salazar MG, et al. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:7552-7.
44. Whitcomb JM, Huang W, Fransen S, Limoli K, Toma J, Wrin T, et al. Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:566-75.
45. Poveda E, Alcami J, Paredes R, Córdoba J, Gutiérrez F, Llibre JM, et al. Genotypic determination of HIV tropism - clinical and methodological recommendations to guide the therapeutic use of CCR5 antagonists. *AIDS Rev.* 2010;12:135-48.
46. McGovern RA, Thielen A, Mo T, Dong W, Woods CK, Chapman D, et al. Population-based V3 genotypic tropism assay: a retrospective analysis using screening samples from the A4001029 and MOTIVATE studies. *AIDS.* 2010;24:2517-25.
47. Swenson LC, Moores A, Low AJ, Dong W, Woods C, et al. Improved detection of CXCR4-using HIV by V3 genotyping: application of population-based and "deep" sequencing to plasma RNA and proviral DNA. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010;54:506-10.
48. Beerwinkel N, Daumer M, Oette M, Korn K, Hoffmann D, Kaiser R, et al. Geno2pheno: Estimating phenotypic drug resistance from HIV-1 genotypes. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:3850-5.
49. Jensen MA, Li FS, Van't Wout AB, Nickle DC, Shriner D, He HX, et al. Improved Coreceptor Usage Prediction and Genotypic Monitoring of R5-to-X4 Transition by Motif Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 env V3 Loop Sequences. *J Virol.* 2003;77:13376-88.
50. Martínez-Prats L, Luczkowiak J, Pascual-Pareja JF, Sierra O, Gutiérrez F, Zurita S, et al. Genotypic prediction of HIV-1 coreceptor usage based on single genome analysis of proviral DNA. *Antivir Ther.* 2010;15:A95.
51. Sánchez V, Masià M, Robledano C, Padilla S, Ramos JM, Gutiérrez F. Performance of genotypic algorithms for predicting HIV-1 tropism measured against the enhanced-sensitivity Trofile coreceptor tropism assay. *J Clin Microbiol.* 2010;48:4135-9.
52. Verhofstede C, Brudney D, Reynaerts J, Vaira D, Fransen K, De Bel A, et al. Concordance between HIV-1 genotypic coreceptor tropism predictions based on plasma RNA and proviral DNA. *HIV Med.* 2011;12:544-52.
53. Paar C, Geit M, Stekel H, Berg J. Genotypic prediction of human immunodeficiency virus type 1 tropism by use of plasma and peripheral blood mononuclear cells in the routine clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2011;49:2697-9.
54. Dahl V, Palmer S. Establishment of drug-resistant HIV-1 in latent reservoirs. *J Infect Dis.* 2009;199:1258-60.
55. Wind-Rotolo M, Durand C, Cranmer L, Reid A, Martinson N, Doherty M, et al. Identification of nevirapine-resistant HIV-1 in the latent reservoir after single-dose nevirapine to prevent mother-to-child transmission of HIV-1. *J Infect Dis.* 2009;199:1301-9.
56. Martínez-Prats L, McKinnon JE, Sierra O, Gutiérrez F, Zurita S, Luczkowiak J, et al. Detection of circulating and non-circulating HIV-1 Drug Resistant Mutations in whole blood DNA by Clonal Resistance Analysis. Submitted 2012.
57. Parisi SG, Boldrin C, Cruciani M, Nicolini G, Cerbaro I, Manfrin V, et al. Both human immunodeficiency virus cellular DNA sequencing and plasma RNA sequencing are useful for detection of drug resistance mutations in blood samples from antiretroviral-drug-naïve patients. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1783-8.
58. Bi X, Gatanaga H, Ida S, Tsuchiya K, Matsuoka-Aizawa S, et al. Emergence of protease inhibitor resistance-associated mutations in plasma HIV-1 precedes that in proviruses of peripheral blood mononuclear cells by more than a year. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003;34:1-6.
59. Delaugerre C, Braun J, Charreau I, Delarue S, Nere ML, De Castro N, et al. Comparison of resistance mutation patterns in historical plasma HIV RNA genotypes with those in current proviral HIV DNA genotypes among extensively treated patients with suppressed replication. *HIV Med.* 2012;13:517-25.
60. Wirlden M, Soulie C, Valantin MA, Fourati S, Simon A, Lambert-Niclot S, et al. Historical HIV-RNA resistance test results are more informative than proviral DNA genotyping in cases of suppressed or residual viraemia. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66:709-12.
61. Bukrinsky MI, Stanwick TL, Dempsey MP, Stevenson M. Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science.* 1991;254:423-7.
62. Blankson JN, Finzi D, Pierson TC, Sabundayo BP, Chadwick K, Margolick JB, et al. Biphasic decay of latently infected CD4+ T cells in acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis.* 2000;182:1636-42.
63. MacLean D, Jones JDG, Studholme DJ. Application of 'next-generation' sequencing technologies to microbial genetics. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7:287-96.
64. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* 2008;26:1135-45.
65. Archer J, Braverman MS, Taillon BE, Desany B, James I, Harrigan PR, et al. Detection of low-frequency pretherapy chemokine (CXC motif) receptor 4 (CXCR4)-using HIV-1 with ultra-deep pyrosequencing. *AIDS.* 2009;23:1209-18.
66. Dudley DM, Chin EN, Bimber BN, Sanabani SS, Tarosso LF, Costa PR, et al. Low-cost ultra-wide genotyping using Roche/454 pyrosequencing for surveillance of HIV drug resistance. *PLoS One.* 2012;7:e36494.