

Diagnóstico de las infecciones por subtipos no B del VIH-1 y por VIH-2

Carlos Toro^a, Aranzazu Amor^a y Vicente Soriano^b

^aServicio de Microbiología. Hospital Carlos III. Madrid. España.

^bServicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Carlos III. Madrid. España.

La diversidad genética del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) constituye un reto para su identificación y caracterización microbiológica. A la continua aparición de nuevas variantes se une la diseminación global de tipos, subtipos y formas recombinantes, lo que obliga a conocer la fiabilidad de las pruebas diagnósticas empleadas para reconocer dichas cepas. En esta revisión se analizan los problemas que actualmente plantean los métodos de cribado, diagnóstico y monitorización de las variantes genéticas distintas del VIH-1 subtipo B. También se examina el rendimiento de algunos algoritmos diagnósticos de introducción más reciente, como los propuestos para caracterizar el tropismo viral. Mientras que el comportamiento de las pruebas serológicas y de ácidos nucleicos es excelente para la mayoría de las cepas del VIH, exceptuando las genéticamente más separadas (VIH-1 grupos O, N y VIH-2), el de las herramientas bioinformáticas es más pobre, y principalmente es fiable para el subtipo B del VIH-1. En conclusión, la continua diversidad genética del VIH obliga a estar atento al rendimiento de las pruebas de cribado y es un estímulo constante para el desarrollo de técnicas moleculares que aseguren la detección de todas las infecciones por VIH. La incorporación de los resultados de estudios *in vitro* y clínicos sobre las variantes distintas del VIH-1 subtipo B permitirá una mejora de las plataformas bioinformáticas.

Palabras clave: VIH-1 subtipos no B. VIH-2. Diagnóstico serológico. Carga viral.

Diagnosis of HIV-1 non-B subtypes and HIV-2

The high genetic diversity of human immunodeficiency virus (HIV) poses a significant challenge to the diagnosis and microbiological characterization of HIV infection. Because of the continual emergence of new variants and

the global spread of HIV groups, subtypes and recombinant forms, accurate diagnostic tools are of prime importance.

The present review analyzes the problems posed by HIV assays for antibody screening, nucleic acid testing and patient monitoring in HIV-1 non-B subtypes, as well as the utility of some recently introduced genetic algorithms, such as those proposed for the characterization of viral tropism. Overall, the reliability of serological and molecular tests for HIV-1 strains is high, except for the more genetically diverse HIV variants (HIV-1 group O, N, and HIV-2). In contrast, genetic algorithms show acceptable accuracy for HIV-1 subtype B, but are less accurate for non-B subtypes.

In conclusion, the ongoing evolution of HIV requires constant monitoring of the performance of screening tests and provides a stimulus to the development of molecular assays to detect all spreading and emerging HIV variants. The availability of both *in vitro* and clinical data from studies of HIV-1 non-B subtypes will improve the performance of bioinformatics tools.

Key words: HIV-1 non-B subtypes. HIV-2. Serological diagnosis. Viral load.

Introducción

La variabilidad genética del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) constituye un desafío para el desarrollo de métodos fiables que permitan realizar correctos cribado, identificación y monitorización de la infección viral. Este hecho es especialmente relevante por la introducción de múltiples variantes del VIH como consecuencia de la inmigración o los viajes internacionales. Frente a estos virus divergentes, el rendimiento de las pruebas diagnósticas puede ser inferior¹. En la actualidad, más del 20% de las nuevas infecciones por VIH en nuestro país y gran parte de Europa se debe a cepas distintas del VIH-1 subtipo B, que es el predominante en el mundo occidental². Este nuevo panorama epidemiológico ha incrementado el interés por estas variantes en aspectos tales como su correcta detección¹, tasa de progresión y respuesta al tratamiento antirretroviral³. Recientemente, esta misma revista ha publicado una excelente actualización del diagnóstico de la infección por el VIH⁴. La presente revisión tiene como objeto complementarla, centrándose en los problemas que plantean la identificación

Este trabajo se ha realizado con ayudas del FIS (n.º CP 05/00300), FIPSE (n.º 36483/05), Red de Investigación en SIDA (ISCIII-RETIC RD06), Agencia Lain Entralgo y Fundación Investigación y Educación en Sida (IES).

Correspondencia: Dr. C. Toro.
Servicio de Microbiología. Hospital Carlos III.
Sinesio Delgado, 10. 28029 Madrid. España.
Correo electrónico: carlostororueda@hotmail.com

y caracterización de las variantes genéticas menos estudiadas del VIH.

Clasificación

El VIH es un retrovirus perteneciente al género *Lentivirus*. Se clasifica en 2 tipos: el VIH-1 y el VIH-2, que comparten una identidad genética del 40-50%. El VIH-1 es el responsable mayoritario de la pandemia mundial y de casi todos los casos de sida; en cambio el VIH-2 es menos patógeno y se encuentra confinado principalmente en zonas de África occidental.

Las cepas del VIH-1 se han asignado a 3 grupos: el grupo M (*main* o principal), el grupo O (*outlier*), y el grupo N (no M, no O), cada uno de los cuales proviene de diferentes saltos interespecie entre primates y humanos. El VIH-1 grupo M es el causante de la actual pandemia, y está dividido en 9 subtipos (A-D, F-H, J, K) y éstos, a su vez, en subsubtipos. El VIH-1 grupo O es endémico en Camerún, donde representa el 1-6% de los casos de infección por VIH-1, mientras que en Europa y Estados Unidos se ha descrito esporádicamente. El VIH-1 grupo N es muy infrecuente, con menos de una docena de casos comunicados, todos ellos en sujetos procedentes de Camerún.

El subtipo B, dentro del grupo M del VIH-1, es el más frecuente en Europa y América, y el mejor estudiado. Sin embargo, la mayoría de casos de infección por VIH-1 en el mundo se originan por el resto de subtipos, llamados genéricamente "no B", y cuya prevalencia además va en aumento en los países desarrollados. Por su parte, el VIH-2 consta de 8 genotipos (A-H), cada uno procedente de diferentes saltos interespecie entre su hospedador natural (el mono "sooty mangabey") y el ser humano. Tan sólo los genotipos A y B tienen importancia epidemiológica, siendo el genotipo A el más frecuente.

La anterior clasificación del VIH ha aumentado en complejidad debido a la frecuente recombinación genética. Dentro del VIH-1 grupo M se han descrito cepas recombinantes entre los 9 subtipos, denominadas formas recombinantes circulantes (CRF) o formas recombinantes únicas (URF). Las CRF se forman por fragmentos genómicos de distintos subtipos y se caracterizan por tener puntos de recombinación comunes y conocidos, así como por haber sido reconocidas en más de 3 individuos no relacionados epidemiológicamente. Las URF se han encontrado en individuos aislados o en grupos de personas infectadas relacionadas epidemiológicamente, y no comparten los puntos de recombinación intersubtipo con las CRF conocidas. Hasta el momento se han descrito 37 CRF y su número va en continuo aumento. Las CRF se designan por orden cronológico y por los subtipos genéticos que las han originado.

Este fenómeno de recombinación también se ha descrito recientemente entre cepas VIH-2 de los genotipos A y B⁵. Estudios *in vitro* incluso han demostrado que es posible la formación de recombinantes entre el VIH-1 y el VIH-2⁶. Teniendo en cuenta que a veces es necesario utilizar pruebas específicas para el diagnóstico de ciertas variantes, esta dinámica genética puede tener repercusiones en el rendimiento de las pruebas diagnósticas actualmente disponibles.

Pruebas diagnósticas

Determinaciones serológicas

El diagnóstico de la infección por VIH se basa fundamentalmente en la detección de anticuerpos. Para ello, se utilizan pruebas de cribado y, posteriormente, las muestras reactivas se confirman mediante técnicas más específicas, las más utilizadas son el *Western-blot* (WB) y el *immunoblot*⁴.

El enzimoimmunoanálisis (EIA) es la técnica más frecuentemente empleada como prueba de cribado. La mayoría de los EIA de tercera generación lleva incorporado proteínas recombinantes o péptidos sintéticos de la región de la envuelta del VIH-1, incluyendo el grupo O, así como del VIH-2. Este cóctel antigénico proporciona una elevada sensibilidad para la detección de los 2 virus y sus distintas variantes genéticas, incluyendo el VIH-1 grupo N y las formas recombinantes. En los últimos años se han introducido los EIA de cuarta generación, algunos de ellos con la utilización de sustratos fluorescentes (pruebas ELFA, *enzyme-linked fluorescent assay*). Los EIA de cuarta generación se caracterizan por la inclusión de anticuerpos frente al antígeno p24 en la fase sólida del ensayo, con objeto de reducir el período ventana. En general, la sensibilidad de las pruebas de última generación para el diagnóstico de distintas variantes del VIH es excelente⁷⁻¹¹. No obstante, se han comunicado aumentos en el umbral de detección que afectan tanto a la determinación del antígeno p24 como a los anticuerpos. Con respecto a la antigenemia, la pérdida de sensibilidad compromete fundamentalmente a las cepas del VIH-1 grupo O^{7,8}. Se sabe que los anticuerpos monoclonales usados para la captura del antígeno p24 pueden no detectar ciertas variantes, lo cual es especialmente trascendente para algunas cepas del grupo O por su divergencia genética¹². Con mucha menos frecuencia se ha descrito disminución del nivel de detección de antigenemia en algunos EIA para los subtipos A, B y C del VIH-1, así como para el VIH-2⁷.

La detección de anticuerpos con los EIA de cuarta generación es óptima para todas las variantes del VIH-1⁷⁻¹¹. Tan sólo se ha observado una menor sensibilidad frente a los anticuerpos de algunas cepas del grupo O y del VIH-2⁷. La ausencia total de detección de anticuerpos en individuos infectados por el VIH no parece que se deba a la infección por variantes genéticas poco usuales, sino a factores relacionados con la incapacidad del huésped para generar una respuesta humoral específica¹³. De manera anecdótica, se ha comunicado una ausencia en la respuesta de anticuerpos en individuos infectados por subtipos VIH-1 grupos C, F y O, si bien no fue generalizada y los pacientes mostraban reactividad serológica al emplear otros EIA¹⁰.

Entre las pruebas de cribado, en los últimos años han adquirido una gran popularidad los denominados tests rápidos. Muchas de ellas incorporan en su fase sólida exclusivamente péptidos sintéticos que representan la región inmunodominante (RID) de la proteína transmembrana de la envuelta: gp41 en el caso del VIH-1 y gp36 en el del VIH-2. El 99% de los sujetos infectados por VIH produce anticuerpos frente a estas proteínas. La RID de gp41 comprende 3 dominios: el epítipo de la respuesta de los linfocitos T citotóxica, el bucle de cisteínas y una región ecto-

dominante. De estos 3 dominios, el bucle de cisteínas conformado por un puente disulfuro entre ellas (aminoácidos 607 a 613: CSGKLLIC) representa el fragmento más inmunogénico. Se trata de una región muy conservada y es la que suele incluirse en los ensayos con péptidos sintéticos. La eliminación de este bucle por la mutación de una cisteína suprime la unión de anticuerpos, lo que sugiere que esta estructura tridimensional es imprescindible para su reconocimiento¹⁴. Otras mutaciones dentro de esta estructura también afectan a la reactividad humoral, por lo que polimorfismos en esta zona pueden llevar consigo una merma de sensibilidad en la detección de anticuerpos. En concreto, un polimorfismo en la posición 611, con un cambio de una lisina por una histidina, puede producir una ausencia de reactividad serológica¹⁵. Este cambio aparece principalmente en el VIH-1 subtipo D, en el que ocasionalmente se han descrito estos falsos negativos^{16,17}. Sin embargo, dicho polimorfismo puede aparecer en menor medida en el resto de subtipos y producir un diagnóstico erróneo. Es de reseñar que esta ausencia de reactividad parece afectar fundamentalmente a las pruebas que sólo incluyen los péptidos sintéticos de la región del bucle; cuando el ensayo incluye péptidos más largos, que cubren las otras regiones inmunodominantes del virus, este problema desaparece^{18,19}.

Las pruebas de confirmación más utilizadas son el WB y el *immunoblot*. No obstante, dada la diversidad genética, el WB del VIH-1 no sirve para diagnosticar los grupos O y N, que producen en general patrones indeterminados. En estos casos hay que recurrir a métodos genéticos. El *immunoblot*, al basarse en la detección de anticuerpos mediante péptidos sintéticos, puede plantear los mismos problemas que hemos comentado con los tests rápidos cuando incluyen sólo la RID transmembrana.

Los resultados serológicos que nos pueden hacer sospechar la infección por variantes poco habituales del VIH son la presencia de una reactividad alta en una prueba de EIA o ELFA, junto con un WB para VIH-1 indeterminado, o un *immunoblot* indeterminado o negativo. Los datos epidemiológicos como la procedencia africana (grupos O, N y VIH-2) o de Portugal, Brasil o India (VIH-2) nos pueden orientar hacia un diagnóstico correcto.

Determinaciones de ácidos nucleicos

Carga viral

Los estudios realizados parecen confirmar que las técnicas de carga viral de última generación, basadas la mayoría de ellas en PCR a tiempo real, detectan todos los subtipos del VIH-1 grupo M. Las diferencias más significativas se encuentran al analizar la respuesta frente a variantes del grupo O y VIH-2. Entre las diversas plataformas que han estudiado dichas variantes, el ensayo Versant[®] HIV-1 RNA v3.0 (Siemens) permite detectar el grupo O, aunque no en todos los casos. Con el método NucliSens[®] EasyQ HIV-1 v1.1 (bioMérieux), la detección de cepas del grupo O es mayor²⁰ y presenta, como ventaja adicional, una elevada fiabilidad para la cuantificación del subtipo A del VIH-2²¹, virus para el que no hay ninguna técnica comercializada de carga viral hasta el momento. Por último, el ensayo *real time* HIV-1 desarrollado por Abbott es el que tiene una mejor rentabilidad para cuantificar virus de los grupos O y N²².

Pruebas genotípicas de resistencia

Hay diversos ensayos genotípicos con objeto de identificar las mutaciones de resistencia en los genes de la transcriptasa inversa y proteasa. Se basan en la secuenciación genética o en el empleo de hibridación con sondas en tiras de nitrocelulosa para identificar mutaciones específicas. Entre los métodos de secuenciación, los comerciales más utilizados son TRUGENE[®] HIV-1 Genotyping Test (Siemens) y ViroSeq[®] HIV Genotyping System (Abbott), mientras que para la identificación por hibridación el más empleado es Versant[®] HIV-1 Resistance Assay (LiPA, Siemens). Todos estos ensayos usan cebadores diseñados para la amplificación de subtipos B del VIH-1, por lo que la presencia de polimorfismos en subtipos no B podría acarrear un menor rendimiento. Esto es especialmente relevante en los ensayos de hibridación²³. Además, este tipo de metodología tiene la limitación añadida de que no permite analizar el papel de los polimorfismos en los subtipos no B en posiciones distintas de las incluidas en dichas pruebas. Los tests que se basan en la secuenciación permiten superar este inconveniente. En el caso de ViroSeq[®], el rendimiento es óptimo para subtipos no B y recombinantes²⁴. Con TRUGENE[®], la rentabilidad para estas variantes es excelente, si bien obliga a la realización de más de una determinación con diferentes parejas de cebadores²⁵.

Diagnóstico de las coinfecciones

Un problema de difícil solución es el diagnóstico de las coinfecciones entre virus del grupo M y variantes más alejadas genéticamente (grupo O, N y VIH-2). Esto tiene especial interés en el caso del grupo O y el VIH-2, ya que son intrínsecamente resistentes a los no análogos de nucleósidos y es necesario identificar la coinfección, a fin de establecer el tratamiento apropiado. La detección de coinfecciones por VIH-1 grupo M y grupos O/N es complicada. Únicamente el empleo de EIA específicos frente a los grupos O y N, no disponibles comercialmente, podría permitir su identificación¹. No obstante, los antecedentes epidemiológicos y la respuesta a la terapia pueden orientar el diagnóstico de la coinfección sobre todo si no se produce una mejoría en la cifra de linfocitos CD4 en un paciente con infección por VIH-1, en el que la carga viral permanece indetectable (p. ej. falsa negatividad por tratarse del grupo O que ha desarrollado resistencias).

Más fácil es el diagnóstico de la coinfección por VIH-1 grupo M y VIH-2. Actualmente hay WB de VIH-1 que incorporan un péptido sintético para VIH-2, y cuya reactividad permite sospechar la coinfección. La realización de un WB específico para VIH-2 es necesaria para llegar al diagnóstico correcto. Las técnicas confirmatorias de *immunoblot* que incorporan péptidos sintéticos frente al VIH-1 y al VIH-2 también orientan hacia la presencia de una coinfección. En este caso, una dilución seriada de la muestra permite descartar, de una forma simple, las reacciones cruzadas de las verdaderas coinfecciones.

Herramientas diagnósticas bioinformáticas

Resistencias a los antirretrovirales

Se han desarrollado varios algoritmos genéticos que permiten realizar una interpretación de la sensibilidad a

los antirretrovirales a partir de las mutaciones encontradas en una secuencia, sin tener que acudir a los ensayos fenotípicos. Todos ellos están contruidos sobre la base de la información clínica y de laboratorio disponible, principalmente para el VIH-1 subtipo B. Hasta ahora, ninguno de estos sistemas incluye reglas de interpretación según la variante genética. Sin embargo, algunos subtipos no B pueden desarrollar mutaciones específicas, distintas de las de las cepas B, bajo un mismo régimen terapéutico^{26,27}. En un estudio reciente, empleando varios de estos algoritmos de interpretación de resistencias, se han observado discrepancias con distintos patrones de mutaciones según el subtipo del VIH-1 analizado²⁸. Todo lo anterior indica la necesidad de estudios clínicos e *in vitro* que permitan conocer el alcance real de determinados patrones de mutaciones de resistencia en los diferentes subtipos del VIH-1. Mientras tanto, los resultados de resistencia de las herramientas bioinformáticas deben tomarse con precaución para los subtipos no B.

Subtipificación

Las pruebas de resistencia genotípicas han producido un incremento exponencial en el número de secuencias disponibles del VIH-1. Esto ha llevado al desarrollo de herramientas bioinformáticas destinadas a genotipificar estos virus con objeto de conocer la diversidad de las cepas circulantes, así como la posible aparición de nuevas variantes. Las plataformas más utilizadas en la actualidad para la subtipificación rápida de las cepas del VIH-1 son las desarrolladas por la Universidad de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/>), los NIH americanos (<http://www.ncbi.nlm.gov/projects/genotyping/formpage>) y el Instituto REGA de la Universidad de Lovaina (<http://www.bioafrica.net/sutypepool/html/>).

Los estudios realizados hasta la fecha han mostrado que estos métodos proporcionan resultados muy fiables para la identificación de los subtipos B, C y H del VIH-1. Sin embargo, estos programas presentan un rendimiento menor para el resto de subtipos y recombinantes^{29,30}. Estos datos no vienen sino a corroborar la alta capacidad del VIH-1 para generar variantes que desafían cualquier intento de implantar sistemas de clasificación rígidos. Por tanto, ante la duda, siempre es aconsejable acudir al análisis filogenético, a ser posible examinando múltiples regiones del genoma viral, para una correcta caracterización de la cepa.

Tropismo

La introducción de los antagonistas del correceptor CCR5 para el tratamiento de la infección por el VIH-1 ha incrementado el interés por determinar el tropismo de las cepas virales. Estos fármacos son activos únicamente frente a cepas R5, por lo que debe determinarse el uso del correceptor antes de su administración. Para ello, los ensayos fenotípicos son los más fiables, pero presentan el problema de ser laboriosos, caros y requerir laboratorios especializados. Para superar estos inconvenientes se han desarrollado programas bioinformáticos que permiten conocer el tropismo a partir de una secuencia problema. Estos predictores genotípicos tienen la limitación, como el resto de plataformas bioinformáticas, de tener un diseño basado fundamentalmente en las características genéti-

cas del subtipo B, por lo que la alta diversidad genética de VIH-1 puede representar un serio obstáculo para su fiabilidad.

La principal aplicación de estos algoritmos genéticos en la clínica es excluir la presencia de cepas X4 y X4/R5 duales trópicas en los pacientes potenciales candidatos para los antagonistas de CCR5. Hasta ahora, pocos estudios han evaluado el rendimiento diagnóstico de estos métodos en subtipos no B, comparándolos con cepas del subtipo B. En uno de ellos se examinaron hasta 8 predictores genotípicos, y se observó que la concordancia de estos métodos con los ensayos fenotípicos, así como la sensibilidad para detectar variantes X4, era más baja en subtipos no B que en variantes B³¹. Por lo tanto, hasta la fecha, estos programas son relativamente fiables para determinar el uso del correceptor en subtipos B, pero su rendimiento es todavía pobre para variantes no B, sobre todo para identificar cepas X4.

En conclusión, mientras que el rendimiento de las pruebas serológicas y de ácidos nucleicos es elevado para la mayoría de las cepas del VIH exceptuando las genéticamente más separadas (VIH-1 grupos O, N y VIH-2), el de las herramientas bioinformáticas es más pobre, siendo fiable principalmente para el subtipo B del VIH-1. La continua diversidad genética del virus obliga a estar atento acerca del rendimiento de las pruebas de cribado actuales y estimula el desarrollo de técnicas moleculares que aseguren la detección de todas las infecciones por VIH.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Brennan C, Bodelle P, Coffey R, Harris B, Holzmayer V, Luk K, et al. HIV global surveillance: foundation for retroviral discovery and assay development. *J Med Virol.* 2006;78 Suppl 1:S24-9.
- Holguín A, Aracil B, Álvarez A, Barros C, Soriano V. Prevalence of HIV-1 non-B subtypes in foreigners living in Madrid, Spain, and comparison of the performances of the AMPLICOR HIV-1 MONITOR version 1.0 and the new automated version 1.5. *J Clin Microbiol.* 2001;39:1850-4.
- Taylor B, Sobieszek M, McCutchan F, Hammer S. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med.* 2008;358:1590-602.
- López-Bernaldo de Quirós JC, Delgado R, García F, Eiros JM, Ortiz de Lejarazu R. Diagnóstico microbiológico de la infección por el VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007;25:632-8.
- Yamaguchi J, Vallari A, Ndembu N, Coffey R, Ngansop C, Mbanya D, et al. HIV type 2 intergroup recombinant identified in Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2008;24:86-91.
- Motomura K, Chen J, Hu W. Genetic recombination between HIV-1 and HIV-2, two distinct human lentiviruses. *J Virol.* 2008;82:1923-33.
- Ly T, Martin L, Daghfal D, Sandridge A, West D, Bristow R, et al. Seven HIV antigen-antibody combination assays: evaluation of HIV seroconversion sensitivity and subtype detection. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3122-8.
- Weber B, Berger A, Rabenau H, Doerr H. Evaluation of a new combined antigen and antibody HIV screening assay, VIDAS HIV DUO Ultra. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1420-6.
- Weber B, Gürtler L, Thorstensson R, Michl U, Mühlbacher A, Bürgisser P, et al. Multicenter evaluation of a new automated fourth-generation HIV screening assay with a sensitive antigen detection module and high specificity. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1938-46.
- Ly T, Laperche S, Brennan C, Vallari A, Ebel A, Hunt J, et al. Evaluation of the sensitivity and specificity of six HIV combined p24 antigen and antibody assays. *J Virol Methods.* 2004;122:185-94.
- Kwon J, Yoon S, Lee C, Lim C, Lee K, Sung H, et al. Performance evaluation of three automated HIV antigen-antibody combination immunoassays. *J Virol Methods.* 2006;133:20-6.

12. Tersmette M, Winkel I, Groenink M, Gruters R, Spence R, Saman E, et al. Detection and subtyping of HIV-1 isolates with a panel of characterized monoclonal antibodies to HIV p24_{gag}. *Virology*. 1989;171:149-55.
13. Toro C. Absence of HIV-1 antibody response in HIV patients: what is the foe, the virus or the host? *AIDS Rev*. 2007;9:188-9.
14. Xu JY, Gorny MK, Palker T, Karwowska S, Zolla-Pazner S. Epitope mapping of two immunodominant domains of gp41, the transmembrane protein of HIV type 1, using ten human monoclonal antibodies. *J Virol*. 1991;65:4832-8.
15. Horal P, Svennerholm B, Jeansson S, Rymo L, Hall W, Vahlne A. Continuous epitopes of the HIV-1 transmembrane glycoprotein and reactivity of human sera to synthetic peptides representing various HIV-1 isolates. *J Virol*. 1991;65:2718-23.
16. Brennan C, Lund J, Golden A, Yamaguchi J, Vallari A, Phillips J, et al. Serologic and phylogenetic characterization of HIV-1 subtypes in Uganda. *AIDS*. 1997;11:1823-32.
17. Koch W, Sullivan P, Roberts C, Francis K, Downing R, Mastro T, et al. Evaluation of United States-licensed HIV immunoassays for detection of group M viral variants. *J Clin Microbiol*. 2001;39:1017-20.
18. Dorn J, Masciotra S, Yang C, Downing R, Biryahwaho B, Mastro T, et al. Analysis of genetic variability within the immunodominant epitopes of envelope gp41 from HIV-1 group M and its impact on HIV-1 antibody detection. *J Clin Microbiol*. 2000;38:773-80.
19. Aghokeng A, Ewane L, Awazi B, Nanfack A, Delaporte E, Peeters M, et al. Evaluation of four simple/rapid assays and two fourth-generation ELISAs for the identification of HIV infection on a serum panel representing the HIV-1 group M genetic diversity in Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004;37:1632-40.
20. de Mendoza C, Koppelman M, Montès B, Ferre V, Soriano V, Cuypers H, et al. Multicenter evaluation of the NucliSens EasyQ HIV-1 v1.1 assay for the quantitative detection of HIV-1 RNA in plasma. *J Virol Methods*. 2005;127:54-9.
21. Rodés B, Sheldon J, Toro C, Cuevas L, Pérez-Pastrana E, Herrera I, et al. Quantitative detection of plasma HIV type 2 subtype A RNA by the NucliSens EasyQ Assay (version 1.1). *J Clin Microbiol*. 2007;45:88-92.
22. Tang N, Huang S, Salituro J, Mak WB, Cloherty G, Johanson J, et al. A RealTime HIV-1 viral load assay for automated quantitation of HIV-1 RNA in genetically diverse group M subtypes A-H, group O and group N samples. *J Virol Methods*. 2007;146:236-45.
23. Derdelinckx I, van Laethem K, Maes B, Schrooten Y, de Schouwer K, de Wit S, et al. Performance of the VERSANT HIV-1 resistance assays (LiPA) for detecting drug resistance in therapy-naive patients infected with different HIV-1 subtypes. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003;39:119-24.
24. Eshleman S, Hackett J, Swanson P, Cunningham S, Drews B, Brennan C, et al. Performance of the Celera Diagnostics ViroSeq HIV-1 genotyping system for sequence-based analysis of diverse HIV type 1 strains. *J Clin Microbiol*. 2004;42:2711-7.
25. Tong C, Mullen J, Kulasegaram R, de Ruiter A, O'Shea S, Chrystie I. Genotyping of B and non-B subtypes of HIV type 1. *J Clin Microbiol*. 2005;43:4623-7.
26. Kantor R, Katzenstein D, Efron B, Carvalho P, Wynhoven B, Cane P, et al. Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *PLOS Med*. 2005;2:e112.
27. Poveda E, de Mendoza C, Parkin N, Choe S, García-Gasco P, Corral A, et al. Evidence for different susceptibility to tipranavir and darunavir in patients infected with distinct HIV-1 subtypes. *AIDS*. 2008;22:611-6.
28. Snoeck J, Kantor R, Shafer R, van Laethem K, Deforche K, Carvalho A, et al. Discordance between interpretation algorithms for genotypic resistance to protease and reverse transcriptase inhibitors of HIV are subtype dependent. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:694-701.
29. Gifford R, de Oliveira T, Rambaut A, Myers R, Gale C, Dunn D, et al. Assessment of automated genotyping protocols as tools for surveillance of HIV-1 genetic diversity. *AIDS*. 2006;20:1521-9.
30. Holguín A, Lospitao E, López M, Ramírez de Arellano E, Pena MJ, del Romero J, et al. Genetic characterization of complex inter-recombinant HIV-1 strains circulating in Spain and reliability of distinct rapid subtyping tools. *J Med Virol*. 2008;80:383-91.
31. Garrido C, Roulet V, Chueca N, Poveda E, Aguilera A, Skrabal K, et al. Evaluation of eight different bioinformatic tools to predict viral tropism in different HIV type 1 subtypes. *J Clin Microbiol*. 2008; 46:887-91.