

**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO**

**DINÁMICA DE LA TRANSMISIÓN DEL VIH EN HOMBRES QUE TIENEN SEXO CON
HOMBRES QUE ACUDEN A SITIOS DE ENCUENTRO.**

Tesis para obtener el grado de Doctor (a) en Ciencias de la Salud en Enfermedades
Infecciosas

M. en C. Dayana Nicté Vergara Ortega

Generación 2015-2019

Director de tesis: Dr. Miguel Ángel Sánchez Alemán (CISEI-INSP)

Asesores: Dr. Edgar Enrique Sevilla Reyes

Dra. Verónica Ruíz González

Dr. Hugo López-Gatell Ramírez

Cuernavaca Morelos, Agosto de 2019.

HOJA DE PRESENTACIÓN.

ÍNDICES.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.	14
2. MARCO TEÓRICO.	
2.1 Generalidades.	19
2.2 Estructura del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).	20
2.3 Ciclo de replicación viral.	23
2.4 Tipos de VIH.	27
2.5 Características de la infección.	29
2.6 Diagnóstico.	32
2.7 Tratamiento.	36
2.8 Resistencia a antirretrovirales.	40
2.9 Continuo de atención al VIH.	43
2.10 Transmisión del VIH.	45
2.11 Epidemiología.	49
3. HIPÓTESIS.	54
4. JUSTIFICACIÓN.	54
5. MAPA CONCEPTUAL.	55
6. OBJETIVOS.	
6.1 Objetivo general.	55
6.2 Objetivos específicos.	56
6.3 Objetivos metodológicos.	56
7. MATERIALES Y MÉTODOS.	
7.1 Mapa metodológico general.	57
7.2 Población de estudio.	57
7.3 Sedia™ BED HIV-1 Incidence EIA: Prueba serológica para detección de infección reciente por VIH.	61
7.4 Análisis estadístico de los resultados.	63

7.5 PCR en tiempo real (qPCR).	66
7.6 Ensayo High Resolution Melting (HRM).	74
8. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD.	79
9. RESULTADOS.	
9.1. Estimación de la prevalencia, infecciones recientes e incidencia de VIH entre HSH que acuden a sitios de encuentro.	80
9.1.1 Prevalencia de VIH en la población de estudio.	80
9.1.2 Porcentaje de infecciones recientes e incidencia de VIH (algoritmo RITA).	81
9.1.3 Algoritmo de pruebas para infecciones recientes por VIH (RITA).	81
9.2 Determinación de los factores de riesgo individuales para la prevalencia e infecciones recientes de VIH entre HSH que acuden a sitios de encuentro.	83
9.2.1 Descripción de la población de estudio.	83
9.2.2 Evaluación de factores de riesgo individuales para la prevalencia e incidencia de VIH.	86
9.3 Determinación de los factores de riesgo regionales para la prevalencia, infecciones recientes e incidencia de VIH en HSH que acuden a sitios de encuentro.	89
9.4 Metodología molecular para la diferenciación de infecciones por VIH recientes y no recientes.	92
9.4.1 Extracción de DNA a partir de plasma.	93
9.4.2 RNA a partir de plasma.	93
9.4.3 PCR tiempo real (qPCR) para la amplificación de un fragmento de VIH.	94
9.4.4 Elección del fragmento de VIH para la amplificación: pol.	95
9.4.5 Análisis de las curvas de disociación y secuenciación de los productos.	105

9.4.6 Ensayo HRM: a partir de RNA y DNA.	111
10. DISCUSIÓN.	128
11. CONCLUSIONES.	137
12. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.	139
13. PERSPECTIVAS.	140
14. ANEXOS.	
ANEXO 1. Sedia™ BED HIV-1 Incidence EIA (hoja de trabajo): Prueba serológica para detección de infección reciente por VIH.	141
ANEXO 2. Carta de autorización de uso de muestras e información.	142
ANEXO 3. Acreditación del curso de bioética del CITI Program.	143
ANEXO 4. Acreditación del curso de bioseguridad del CITI Program: programa básico.	143
ANEXO 5. Acreditación del curso de bioseguridad del CITI Program: capacitación inicial.	144
ANEXO 6. HIV Ag/Ab Combo, Architect, Abbott Diagnostics Division™: Prueba de detección de Ag y Ac de VIH.	145
ANEXO 7. ZYMO RESEARCH Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit: extracción de DNA a partir de estuche comercial.	146
ANEXO 8. Protocolo fenol/cloroformo: extracción de DNA a partir de mezclas con solventes.	147
ANEXO 9. QIAamp Viral RNA Mini Kit® de QIAGEN: extracción de RNA a partir de estuche comercial.	148
ANEXO 10. Protocolo de PCR en tiempo real (qPCR) para amplificación de pol 199 pb a partir de DNA.	149
ANEXO 11. Protocolo de PCR en tiempo real con reversotranscripción (RT-qPCR) para amplificación de pol 199 pb a partir de RNA.	152

15. REFERENCIAS.

.....155

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del virión de VIH.21

Figura 2. Organización genómica del VIH.21

Figura 3. Productos proteicos de los genes estructurales de VIH y su organización en el virión.23

Figura 4. Ciclo de replicación viral (modificado).26

Figura 5. Estructura dimérica del ARN viral: *kissing loop complex*.26

Figura 6. Genoma del virus de inmunodeficiencia humana (VIH).27

Figura 7. Evolución de los marcadores virales y serológicos durante las primeras semanas post-infección con VIH-1.29

Figura 8. Evolución clínica típica de la infección por VIH.31

Figura 9. Algoritmo para el diagnóstico serológico de infección por VIH (adaptado).34
Figura 10. Grupos de fármacos antirretrovirales y su sitio de inhibición en el ciclo de replicación viral.39
Figura 11. Representación de poblaciones con idénticas prevalencias de VIH y cargas virales comunitarias (CVC), pero con diferente potencial de transmisión.49
Figura 12. Marco conceptual para las medidas poblacionales de carga viral entre individuos infectados con VIH.53
Figura 13. Regiones y ciudades del país donde se realizaron las encuestas (2011: de línea basal y 2013: de seguimiento).59
Figura 14. Análisis estadístico por tipo de variable.63
Figura 15. Fórmula de Hargrove y colaboradores para el cálculo de la incidencia estimada a partir de estudios transversales.66
Figura 16. Gráfica de amplificación.68
Figura 17. Ciclo umbral (<i>threshold cycle/C_t</i>).68

Figura 18. Curva estándar.69
Figura 19. Curvas de disociación.70
Figura 20. Datos representativos del ensayo <i>HRM</i>76
Figura 21. Curva de disociación y sus márgenes.77
Figura 22. Ejemplo gráfico de un <i>HRM score</i>77
Figura 23. Selección de los valores de T1 y T2.78
Figura 24. Algoritmo de pruebas para infecciones recientes por VIH o <i>RITA</i>82
Figura 25. Gráfica de escenarios de transmisión de VIH por región, de acuerdo con las variables de la cascada de atención al VIH.92
Figura 26. Amplicón diseñado para GAG2.97
Figura 27. Amplicón diseñado para ENV1.97
Figura 28. Confirmación de tamaño del fragmento de interés de <i>pol</i> 139pb VIH.99

Figura 29. Ampliación de <i>pol</i> VIH de 199pb.99
Figura 30. Confirmación de tamaño del nuevo fragmento de interés de <i>pol</i> 199pb VIH.100
Figura 31. Curva de amplificación de qPCR <i>pol</i> 199pb (DNA), a partir de 5 diluciones de <i>pol</i> -VIH.101
Figura 32. Curva estándar de qPCR <i>pol</i> 199pb (DNA), a partir de 5 diluciones.101
Figura 33. Curva de disociación de qPCR <i>pol</i> 199pb (DNA).102
Figura 34. Curvas de disociación de <i>pol</i> 199pb con diferentes Tm's.103
Figura 35. Curva de amplificación de RT-qPCR (RNA), ejemplo bloque 1.104
Figura 36. Curva de disociación de RT-qPCR (RNA), ejemplo bloque 1.104
Figura 37. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de RT-qPCR de <i>pol</i> 199pb.105
Figura 38. Secuencias obtenidas de los productos de amplificación.106

Figura 39. Alineamiento de las 27 secuencias de <i>pol</i> 199pb en el programa Clustal Omega.	107
Figura 40. Resultados <i>HRM</i> de la estandarización de qPCR <i>pol</i> 199pb.	112
Figura 41. Gráficas de salida del análisis <i>HRM</i> de las muestras de DNA, en el software DivMelt.	115
Figura 42. Muestra de DNA reciente 1465277, réplica 1.	118
Figura 43. Muestra de DNA reciente 1465277, réplica 2.	118
Figura 44. Muestra de DNA reciente 1465277, réplica 3.	119
Figura 45. Muestra de DNA reciente 1466297, réplica 2.	119
Figura 46. Muestra de DNA reciente 1466297, réplica 3.	120
Figura 47. Muestra de DNA reciente 1466297, réplica 5.	120
Figura 48. Muestra de DNA reciente 1466297, réplica 6.	121

Figura 49. Muestra de DNA reciente 1466294, réplica 6.121
Figura 50. Muestra de DNA reciente 1466111, réplica 2.122
Figura 51. Muestra de DNA reciente 1466111, réplica 5.122
Figura 52. Muestra de DNA reciente 1466111, réplica 6.123
Figura 53. Muestra de RNA reciente 1465277, réplica 2.123
Figura 54. Muestra de RNA reciente 1465277, réplica 3.124
Figura 55. Muestra de RNA reciente 1466297, réplica 1.124
Figura 56. Muestra de RNA reciente 1466297, réplica 2.125
Figura 57. Muestra de RNA reciente 1466297, réplica 3.125
Figura 58. Muestra de RNA reciente 1466294, réplica 1.126

Figura 59. Muestra de RNA reciente 1466294, réplica 2.126
Figura 60. Muestra de RNA reciente 1466294, réplica 3.127
Figura 61. Muestra de RNA reciente 1466111, réplica 3.127

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Familia Retroviridae (modificada).20
Tabla 2. Tiempo generacional del VIH (adaptado).27
Tabla 3. Signos y síntomas del VIH por etapa clínica (modificado).32
Tabla 4. Probabilidad estimada de adquirir VIH de un individuo infectado por tipo y acto de exposición (traducido).48
Tabla 5. Resumen de diferentes estudios con respecto de la prevalencia de VIH en HSH.51
Tabla 6. Regiones analizadas del genoma de VIH mediante el uso del ensayo <i>High Resolution Melting</i>73

Tabla 7. Análisis descriptivo de la población de estudio.	84
Tabla 8. Características sociodemográficas y de comportamiento sexual, y su asociación con prevalencia e infecciones recientes por VIH entre HSH asistentes a sitios de encuentro.	87
Tabla 9. Estimaciones de prevalencia, incidencia e infecciones recientes y su relación con la cascada de atención de VIH; por región.	90
Tabla 10. Resultados de extracción de DNA, a partir de plasma con el estuche comercial ZYMO Research (columna 2) y con el protocolo Fenol/Cloroformo (columna 4).	93
Tabla 11. Análisis del fragmento GAG2.	95
Tabla 12. Análisis del fragmento POL3.	95
Tabla 13. Análisis del fragmento ENV1.	96
Tabla 14. Análisis de los oligonucleótidos internos para GAG2.	97
Tabla 15. Análisis de los oligonucleótidos internos para ENV1.	98
Tabla 16. Análisis del nuevo fragmento <i>pol</i> de	100

199pb.

Tabla 17. Tm teóricas y experimentales de las secuencias divergentes.110
Tabla 18. Resultados de HRM score obtenidos con el qPCR a partir de DNA.114
Tabla 19. Diversidad nucleotídica/genética calculada con base en la secuenciación.116
Tabla 20. Promedio de los <i>HRM scores</i> obtenidos de las muestras recientes, tanto con DNA como con RNA.117

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

El entendimiento de la dinámica de transmisión del VIH representa la base sobre la cual deben desarrollarse intervenciones en salud pública. La dinámica de transmisión se ha abordado desde diversos enfoques, modelos y poblaciones.

Un abordaje muy utilizado es el basado en el desarrollo y aplicación de los modelos matemáticos. Mediante estos modelos, se trata de explicar la dinámica de transmisión del VIH a través de la definición de variables que podrían tener efecto en la transmisión, y finalmente asociarlas con una expresión matemática (1). Un ejemplo de esto, es el modelo publicado por Mesa-Mazo y colaboradores; el cual fue desarrollado en población heterosexual americana (colombianos). A pesar de que las variables consideradas en este modelo no son las mismas a considerar en poblaciones de alto riesgo (como los hombres que tienen sexo con hombres -HSH-); sus resultados señalan que el uso consistente del condón es de impacto relevante en la transmisión del VIH. Esto sin importar si la medida preventiva atañe a hombres o a mujeres (1).

Un tipo de modelo matemático ampliamente utilizado en la dinámica de transmisión, es el modelo estocástico. Yeghiazarian L. y colaboradores, publicaron un estudio que utiliza sólo la información clínica y los contactos sexuales de los individuos, con la finalidad de aplicar un modelo estocástico a la transmisión de VIH entre HSH (2). El objetivo de este estudio fue el de evaluar algunas medidas preventivas y el impacto que tiene el tiempo en que se inicia la terapia antirretroviral (TARV); situación que aún se encuentra en debate. Este

modelo incluye variables como el estado de la enfermedad y la progresión de la infección en los individuos, la idea es simular escenarios con diferentes estrategias terapéuticas (TARV a distintos tiempos). Este estudio, de manera similar a otros ya publicados concluye que el inicio temprano de la TARV podría tener un efecto negativo en la transmisión del VIH, disminuyéndola (2,3).

Sun X. y colaboradores (4) llevaron a cabo un estudio en HSH chinos mediante la aplicación de modelos estocásticos, en el cual se evaluó el impacto del inicio temprano de la HAART en la transmisión del VIH (específicamente en el número básico de reproducción R_0). En este estudio se consideraron diferentes variables, tales como la eficacia de la HAART, la emergencia de resistencia a los antirretrovirales, el tiempo de inicio de la terapia, la prevalencia de VIH, entre otras. Sus hallazgos sustentan que el inicio temprano de HAART debe ser implementado con reserva y cuidado; sobretodo en los entornos donde los medicamentos eficaces son limitados. Esto principalmente por la generación de mutaciones virales que le otorgan resistencia a ARV, las cuales se generan cuando se usan monoterapias o cuando la diversidad de ARV y sus combinaciones son mínimas. Con respecto de sus hallazgos, se sugiere el desarrollo de estudios más extensos para evaluar la dinámica de transmisión individual (de un individuo a otro) y poblacional (entre individuos); esto principalmente en grupos de riesgo como los HSH ya que ellos pueden constituir el grupo “core”, manteniendo así la transmisión del virus (4).

Existen otros estudios que han abordado la dinámica de transmisión del VIH desde un enfoque más biológico, mediante la búsqueda y comparación de las secuencias genómicas del VIH (principalmente genes estructurales: *gag*, *pol* y *env*). En este tipo de estudios, se hacen comparaciones de un fragmento de las cuasiespecies virales de VIH presentes en cada individuo analizado; y se trata de determinar si estas cuasiespecies coinciden con los individuos con quienes tuvieron contacto; o si tienen alta variabilidad (lo cual indica una evolución rápida de la infección, o un mayor tiempo de establecimiento viral) (5,6). La mayoría de estos estudios se han llevado a cabo en población general o en población con subgrupos como usuarios de drogas intravenosas o inyectables (UDI), heterosexuales y

HSH. En el año 2016, un estudio de este tipo fue realizado en España por Patiño-Galindo y colaboradores (7), e incluyó a 441 individuos. Entre sus hallazgos principales, encontraron que el desarrollo de la infección se daba en un menor tiempo entre HSH con respecto de sus otros grupos poblacionales. Esto se concluyó debido a la alta variación de las secuencias genómicas (pertenecientes a las cuasiespecies virales) encontradas en los HSH, en comparación con los otros grupos poblacionales. Sin embargo, no se indagó en las posibles causas de este hallazgo (7).

Con este mismo enfoque, Chan PA y colaboradores (8) publicaron un estudio que investiga a nivel estatal las redes de transmisión del VIH. En este estudio, la base fue el análisis filogenético de secuencias genómicas del virus (gen *pol*). Los participantes provenían de una cohorte de individuos diagnosticados con VIH entre 2004-2011, en Rhode Island E.U.A. De acuerdo con características demográficas y de comportamiento, las secuencias genómicas analizadas fueron clasificadas en árboles filogenéticos. De las 1166 secuencias que analizaron para la formación de conglomerados de transmisión, resultó que el 52% de ellos estaban formados por secuencias sólo de virus aislados en HSH. A su vez, se determinó que los HSH que formaban estos conglomerados, coincidían en tener múltiples parejas anónimas y en que encontraban parejas sexuales en clubes y tiendas pornográficas. Una de sus conclusiones establece que las redes sexuales entre HSH recién diagnosticados, y coinfectados con otras infecciones de transmisión sexual (ITS), contribuyen a la transmisión activa del VIH. Este grupo podría considerarse como el grupo “core” en la localidad de estudio (8).

Para el año 2015, Li Z. y colaboradores (9) publicaron un estudio donde analizaron los subtipos de VIH, con la finalidad de investigar los orígenes de la transmisión de VIH y la filogenia entre HSH (analizando el gen *pol*). Los 1205 individuos participantes provenían de 13 provincias de China y fueron reclutados entre 2009 y 2014. Además, todos los participantes eran recién diagnosticados y tenían entre 16 y 25 años. Además de encontrar el subtipo B de VIH-1 (el más común), ellos encontraron también algunas formas recombinantes circulantes (CRF) que tenían poco tiempo de introducción en la

población de estudio, y otras que se desconocían. Entre las conclusiones, ellos mencionan que las complejidades de los subtipos y los CRF apoyan firmemente la necesidad de estudios exhaustivos sobre comportamientos de riesgo y su relación con el aumento de los subtipos y variantes de VIH entre HSH (9).

El estudio de redes genéticas de transmisión, mediante el análisis de secuencias específicas del VIH ha dado origen a diversos hallazgos; los cuales permiten vislumbrar los principales grupos o *clusters* de transmisión del VIH en poblaciones definidas. A este respecto, Ragonnet-Cronin y colaboradores detallan la identificación de al menos 1722 *clusters* de transmisión identificados mediante la secuencia del gen pol. Estas secuencias fueron obtenidas del Departamento de Salud Pública de Los Ángeles, a través de sus reportes de análisis de resistencia a fármacos. De manera interesante, ellos ubican a 147 de 345 (43%) mujeres transgénero en la frecuencia más alta de la red de transmisión, y detallan su contacto con al menos una persona de las incluidas en su población de estudio (10). De manera similar, mediante el análisis de secuencias parciales de VIH del Sistema de Vigilancia Nacional de VIH en EUA, Oster y colaboradores lograron identificar clusters de transmisión rápida del VIH. Ellos proponen una metodología donde utilizan dos distancias genéticas entre las secuencias (0.5% y 1.5%) y dos periodos de diagnóstico del virus (histórico y 2013-2015). Con esta metodología ellos encontraron que la combinación 1.5% de distancia genética y el periodo histórico de diagnóstico identifica más de 100 *clusters* de transmisión rápida de VIH; así mismo detallan que la tasa de transmisión en estos puede llegar hasta 33 casos por 100apo. Discuten que sus hallazgos pueden ser utilizados como parte de estrategias de prevención focalizada (11).

Desde un enfoque social, tomando como base los comportamientos sexuales, Boily y colaboradores (12) publicaron un estudio realizado entre HSH, con la finalidad de explicar el incremento en la transmisión del VIH antes y después de la introducción de la TARV. La población de estudio analizada provenía de países industrializados donde el uso de la TARV está ampliamente disponible. La metodología del estudio se basó en la utilización de diagramas de redes sociales, para explicar el fenómeno. En este estudio, se encontró que

una gran parte del aumento en la transmisión del VIH puede estar causada por interacción entre las actividades sexuales de alto riesgo y la TARV. Esto se explica mediante la hipótesis de que aquellos HSH que no pudieron participar en actividades sexuales de alto riesgo, ahora buscaban participar de ellas y lo pueden hacer con individuos altamente disponibles que tienen TARV. Estos últimos, al tener TARV se conciben en menor riesgo de transmisión; lo cual es muy debatible (2,12).

En México, existe poca evidencia sobre la dinámica de transmisión del VIH basada exclusivamente en HSH. Al respecto, en el año 2015 Mehta y colaboradores (13) desarrollaron un estudio en la frontera entre Tijuana (México) y San Diego (E.U.A.). Se incluyó población heterosexual, bisexual y HSH. Los autores analizaron la información sociodemográfica y clínica de cada participante, así como la secuencia genómica viral, obtenida de diez estudios previos en la misma región. Se llevaron a cabo análisis filogenéticos y de redes de transmisión para crear conglomerados. El análisis se realizó con 843 secuencias virales asociadas con su información sociodemográfica; como resultado de ello se obtuvo que variables como la raza, la residencia o el sexo (hombre o mujer) no era relevante para la transmisión. Sin embargo, la preferencia sexual sí tuvo impacto sobre la transmisión, siendo éste más visible en HSH. Aunque la epidemia de VIH en esa región se encontró filogenéticamente compartimentalizada, se pudo vislumbrar que la transmisión es bidireccional entre los dos lados de la frontera. De esta manera se concluyó en la importancia de realizar estudios en esas regiones, principalmente en grupos de riesgo; esto por ser considerada un “*melting pot*” de los grupos de riesgo (13).

En el año 2011 se realizó en nuestro país la primera encuesta de seroprevalencia de VIH en sitios de encuentro de HSH (14,15) . Aunque su objetivo primordial está relacionado con el impacto de medidas preventivas y el acceso a la cascada de atención, la información que de ella resulta puede ser útil como base para modelar la transmisión de VIH entre HSH que acuden a sitios de encuentro en México. Para fines de esta encuesta se definió como sitio de encuentro aquel lugar (principalmente de esparcimiento) donde se reúnen HSH (14,15) . Esta encuesta tiene representatividad nacional y su mapeo se llevó a

cabo en cinco regiones geográficas del país: Noroeste, Noreste, Centro, Centro-Occidente y Sur. Se incluyó en ésta a 8586 individuos provenientes de las 5 regiones. Además de aplicar a cada participante un cuestionario sobre variables sociodemográficas y de comportamiento sexual, también se realizó una prueba rápida de VIH. Entre los principales hallazgos de esta encuesta, resaltan el porcentaje de uso del condón (74% en la última relación sexual), sin embargo esto no asegura un uso consistente. Así también, resultó que sólo el 5.6% de la población entrevistada se percibe como VIH positivo, dato muy por debajo de la prevalencia encontrada que fue del 16.9% (14,15).

En el año 2013, se llevó a cabo la segunda versión de esta encuesta en sitios de encuentro (16). De manera similar a la encuesta 2011, a cada participante se le aplicó un cuestionario sobre variables sociodemográficas y de comportamiento sexual; sin embargo en esta ocasión también se les tomó una muestra biológica (sangre seca en papel filtro o *DBS* por sus siglas en inglés). La información obtenida, así como la muestra biológica representan una base sobre la cual se pretende desarrollar un modelo para indagar en la dinámica de transmisión de VIH entre HSH mexicanos a nivel poblacional. Para ello, se tomará en cuenta tanto el uso de análisis estadísticos que expliquen el fenómeno (analizando variables sociodemográficas, de comportamiento sexual y factores de riesgo a nivel individual y regional), y desde el enfoque biológico el análisis de las secuencias virales de cada individuo. Esto con la finalidad de generar evidencia de los factores que determinan la dinámica de transmisión del VIH en la población de estudio a nivel nacional como regional; así como la determinación de las variables que intervienen en dicha dinámica. De acuerdo a los hallazgos se pretende apoyar en la generación de intervenciones focalizadas que incidan en la prevención de la transmisión del VIH entre HSH.

Por lo tanto, la pregunta de investigación del presente estudio es la siguiente:

¿Cuáles son los factores determinantes de la dinámica de transmisión de VIH entre HSH que acuden a sitios de encuentro, en seis regiones geográficas del país?

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 Generalidades.

El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) es un retrovirus que afecta al sistema inmune (especialmente a los linfocitos T CD4⁺, macrófagos y células dendríticas) (17); de manera que debilita las defensas del cuerpo, aumentando la probabilidad de adquirir otras infecciones (17,18). A medida que el virus destruye las células inmunitarias, la persona se vuelve inmunodeficiente, debido a esto la fase más avanzada de la infección se conoce como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (Sida), la cual puede tardar en promedio de 2 a 15 años en manifestarse (17,19). El VIH es considerado una infección de transmisión sexual (ITS) y la enfermedad resultante (Sida) fue reconocida como una entidad clínica nueva en 1981, y hasta nuestros días representa una de las pandemias más grandes y sostenidas que se hayan conocido (17).

El VIH es un lentivirus que pertenece a la familia *Retroviridae* (Tabla 1). Los retrovirus conforman una familia larga y diversa de virus de ARN definida por denominadores taxonómicos comunes. Estos denominadores incluyen la estructura, la composición genética y las propiedades replicativas. La característica distintiva de la familia es su estrategia replicativa, la cual incluye un paso esencial de la transcripción reversa del ARN viral al DNA de doble cadena (17,18,20).

Familia	Género	Virus
<i>Retroviridae</i>	<i>Alpharetrovirus</i>	Virus de la leucosis aviar
	<i>Betaretrovirus</i>	Virus del tumor mamario del ratón
	<i>Gammaretrovirus</i>	Virus de la leucemia murina y felina
	<i>Deltaretrovirus</i>	HTLV-1 y HTLV-2
	<i>Epsilonretrovirus</i>	Virus cutáneo del Walleye (peces)
	<i>Lentivirus</i>	Virus de inmunodeficiencia en simios, VIH-1 y VIH-2.
	<i>Spumavirus</i>	Virus espumoso del chimpancé

Tabla 1. Familia Retroviridae (modificada) (20).

Entre los retrovirus, sólo los *deltaretrovirus* y los *lentivirus* causan enfermedad en los humanos. Los *lentivirus* se distinguen dentro de la familia por una característica morfológica inusual: sus dos cápsides, una cónica y otra icosaédrica; además de poseer varios genes con función regulatoria en su ciclo viral, los cuales no están presentes en otros retrovirus. Así mismo, la capacidad de persistir y replicarse a pesar de la respuesta inmune humoral y celular, es otra característica específica de los lentivirus (17,21).

2.2 Estructura del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).

El virión de VIH mide aproximadamente entre 100 y 130 nm de diámetro (22). Estructuralmente del interior al exterior, en i) el core el virión posee dos copias idénticas de ARN de cadena sencilla de sentido positivo y las enzimas transcriptasa reversa (RT) e integrasa (IN), ii) dos cápsides: una en forma de cono truncado y otra en forma icosaédrica, iii) una membrana lipídica y en ella glicoproteínas (22–24) (Figura 1).

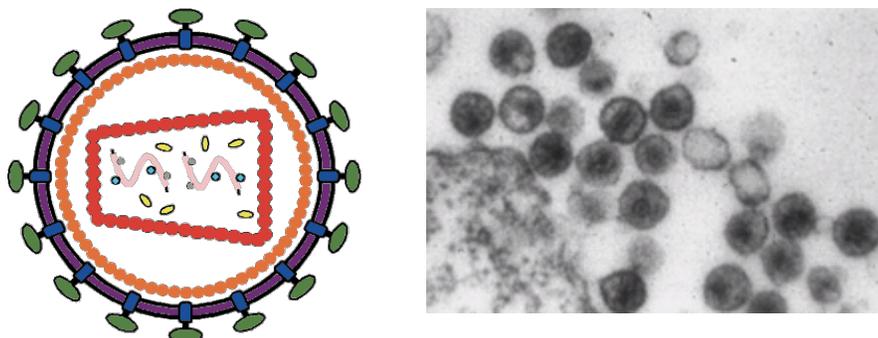
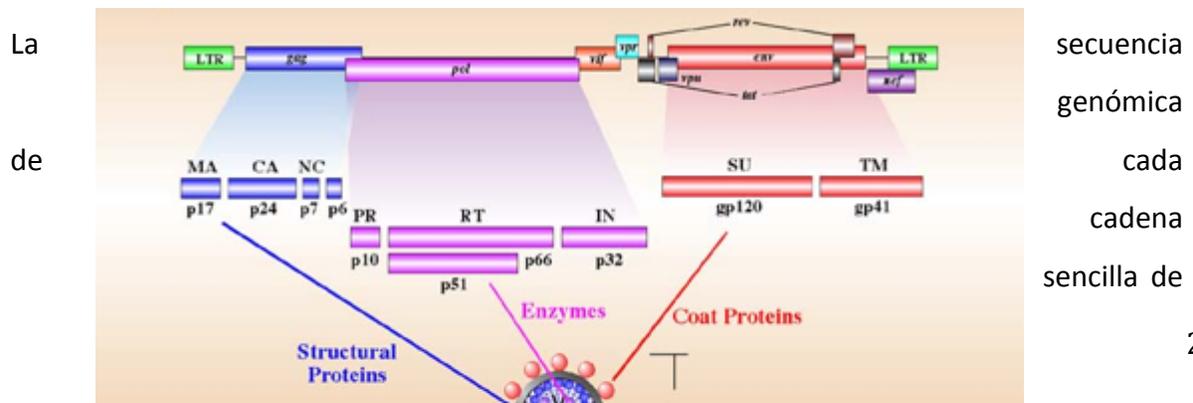


Figura 1. *Izquierda*: componentes estructurales del virión de VIH; en rosa claro se muestran las cadenas de ARN, en rojo la cápside truncada, en anaranjado la cápside icosaédrica, en morado la membrana y en verde-azul las glicoproteínas. *Derecha*: Partículas virales de VIH magnificadas en una micrografía electrónica; en algunas de ellas se puede apreciar la cápside truncada y la membrana (23,24).



ARN, tiene una longitud de aproximadamente 9kb. Este genoma tiene un extremo 5'cap y otro 3' que se encuentra poliadenilado; cuenta con repeticiones terminales largas (LTR), tres genes principales: *gag*, *pol* y *env*; y seis genes adicionales o accesorios: *vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* y *nef* (20–22) (Figura 2).

Figura 2. Organización genómica del VIH. (Tomada de http://andreamariatic.blogspot.mx/2011_04_01_archive.html).

Cada uno de los genes del VIH tiene funciones específicas, las de los genes estructurales se describen a continuación (17,21,22,25) (Figura 3):

- *gag*: codifica las proteínas estructurales de las cápsides (truncada e icosaédrica), necesarias para el ensamble del virión.
- *pol*: codifica la transcriptasa reversa, la proteasa y la integrasa, principales enzimas de la replicación viral.
- *env*: codifica las glicoproteínas de envoltura gp120 y gp41, las cuales son requeridas para la infección de las células.

Así como los genes estructurales, se presume que los genes accesorios también tienen funciones que los caracterizan. En general, se trata de la regulación de la replicación viral y de la interacción del genoma viral con el genoma celular. Sin embargo el conocimiento de estas funciones aún sigue bajo investigación (21,22,25), a continuación se enlistan algunas de las funciones conocidas:

- *vif*: promotor de la infectividad de virus libre, antagonico de inhibidores de la transcripción reversa (ej. APOBEC3G).
- *vpu*: requerido para la liberación eficiente de los viriones, actúa como antagonico de los inhibidores del *budding*.
- *vpr*: activador débil de la transcripción.
- *tat*: activador potente de la transcripción, regulador positivo de la replicación viral.
- *rev*: regulador de la expresión de genes estructurales, aumenta la replicación viral y es regulador negativo de *nef*.
- *nef*: al parecer actúa disminuyendo la expresión viral.

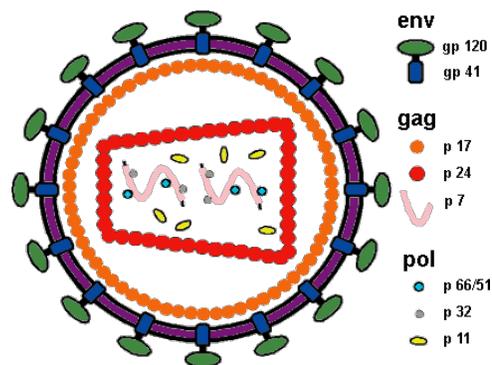


Figura 3. Productos proteicos de los genes estructurales de VIH y su organización en el virión (24).

2.3 Ciclo de replicación viral.

El ciclo de replicación del virus inicia con la unión de las espigas de la envoltura viral al receptor celular de CD4⁺, así como a los receptores de quimiocinas (correceptores) CCR5 en macrófagos y CXCR4 en los linfocitos T (paso 1) (Figura 4). Estas espigas están conformadas por un heterodímero de la glicoproteína gp120 y una proteína

transmembranal gp41. Al término de este paso llamado “fijación”, en la partícula viral se inicia una cascada de cambios conformacionales que inducen la “fusión” de la membrana viral con la membrana celular, lo que genera un poro a través del cual la cápside viral entra a la célula (paso 2). Debido a la fuerte relación conformacional entre la membrana y la cápside icosaédrica, esta última también se disgrega en este paso (22,25).

En el tercer paso del ciclo, se lleva a cabo el “desnudamiento” del material genético, de la cápside truncada que lo contiene; es decir, se libera el contenido del *core* viral. De acuerdo con reportes derivados de análisis cristalográficos, este desnudamiento inicia desde el extremo más estrecho del cono (25).

Una vez libre en el citoplasma, la enzima RT inicia el paso 4 o “transcripción reversa” mediante la síntesis de una cadena negativa de DNA tomando como molde el ARN viral de sentido positivo. Posteriormente, la cadena de ARN viral es degradada por la acción *RNasa* de la RT, para dar paso a la síntesis de la cadena positiva complementaria de DNA. Al término de este paso se ha generado un DNA de doble cadena conocido como DNA proviral (22,25).

Al unirse el DNA proviral y la enzima IN, se forma el complejo de preintegración (*PIC*). Este complejo es “importado al núcleo” para su posterior integración al genoma celular (paso 5). Una vez en el núcleo, la enzima IN como parte del *PIC* dirige la “integración” del genoma viral que finaliza con la formación del provirus (paso 6). La enzima IN lleva a cabo dos actividades: el procesamiento de los extremos 3' y la transferencia del DNA. Cada extremo del DNA viral se escinde adyacentemente a la secuencia genómica celular, en un sitio que permita su integración. La IN corta en los hidroxilos de la posición 3' del DNA celular en el surco mayor, y al mismo tiempo une el DNA viral al extremo 5' del DNA celular. Las enzimas celulares completan el proceso de integración mediante la reparación del DNA (22,25).

La integración marca la transición de la replicación viral temprana a la replicación viral tardía. Después de la integración, el paso 7 del ciclo corresponde a la “transcripción” de

los RNAm a partir del provirus ya integrado. La elongación de los transcritos requiere de la acción de las proteínas virales accesorias Tat y Rev, para dar paso a la siguiente etapa en el ciclo de replicación, la “exportación nuclear” (22,24,25).

En el siguiente paso, “traducción”, los ARNm exportados sirven como templatado para la producción de la poliproteína Gag-Pol-Gag (también llamado polipéptido precursor), además de producir también las proteínas accesorias encargadas del ensamble del virión. El extremo N-terminal del polipéptido precursor es miristilado, lo que contribuye a su asociación con la membrana. El ARNm de la proteína Env, da origen a las glicoproteínas de la envoltura; las cuales son sintetizadas y glicosiladas en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (22,24,25).

El “ensamble” es el paso 10 del ciclo y en éste se da la conformación del nuevo virión. Una vez con todos los elementos de la envoltura y con el polipéptido precursor, se lleva a cabo el proceso de “*budding*”. Durante este proceso se forman cuerpos multivesiculares por acción de las proteínas celulares Vps (*vacuolar protein sorting*) que son subunidades del complejo de clasificación endosomal requerido para transportación (ESCRT). El *budding* es una especie de gemación (con referencia a las bacterias) en donde cada vesícula deja el citoplasma cubierta de membrana (25).

Posteriormente, se da paso a la “liberación” de los viriones. Esta etapa comprende la separación total de la membrana del nuevo virión y de la membrana celular. Los viriones liberados son inmaduros, es decir, no infecciosos (25).

El último paso del ciclo de replicación es la “maduración viral”. La proteasa viral se activa durante el ensamble, y esta escinde al polipéptido precursor para generar un conjunto de nuevas proteínas (MA, CA y NC) y péptidos espaciadores (SP). Estas nuevas proteínas re-ensamblan el interior del virión; la proteína MA origina la cápside icosaédrica, la proteína CA da origen a la cápside truncada y la proteína NC cubre al ARN viral (22,25).

En cada virión ahora maduro (infeccioso), se pueden notar las estructuras que se han descrito anteriormente: la membrana con sus glicoproteínas, la cápside icosaédrica, la

cápside truncada, y el *core* viral, que posee las copias de ARN viral en una estructura dimérica llamada *kissing loop complex* que asegura que haya dos copias (Figura 5). Los viriones maduros liberados son capaces de iniciar una nueva infección (22,25,26).

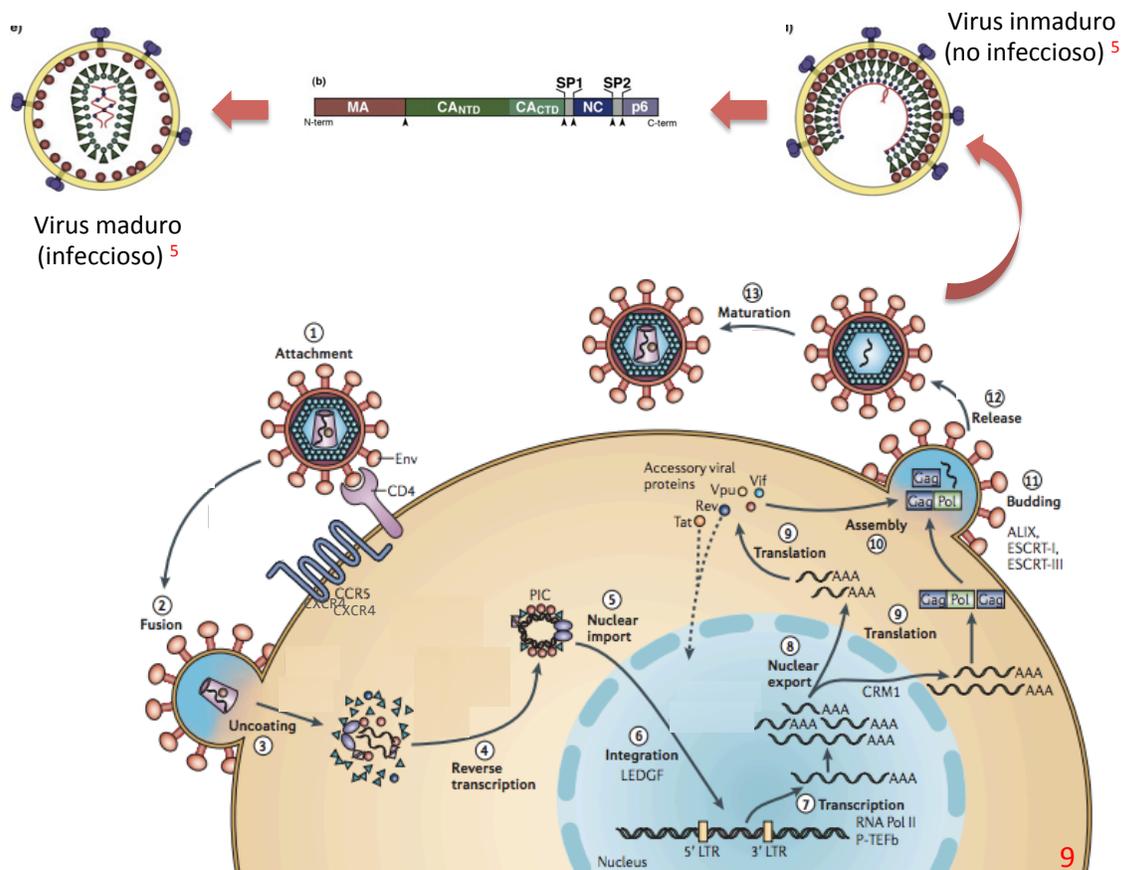


Figura 4. Ciclo de replicación viral (modificado) (22,25).

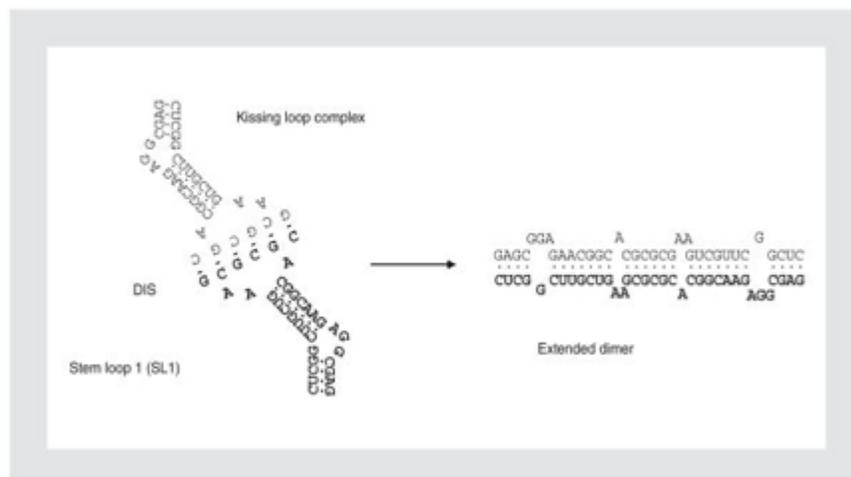


Figura 6. Genoma del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Izquierda: VIH-1, Derecha: VIH-2 (24).

El VIH-1 ha sido clasificado en 4 grupos: M, O, N y P. A su vez, el grupo M se ha dividido en subtipos: A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J, y K (28). El VIH-2 por su parte, está dividido en 8 grupos denominados con letras de la A-H. También existen virus recombinantes que se denominan Formas Recombinantes Circulantes (*CRF*); estas se numeran en forma secuencial y se designan mediante las letras de los subtipos que los componen. Por ejemplo, CRF02-AG se refiere a la segunda forma recombinante circulante reportada, y es una combinación del subtipo A y el subtipo G (28,29).

El VIH-2 sigue restringido al África occidental, en donde se encuentran todos los grupos conocidos; tiene un periodo de incubación de entre 15 y 20 años (más largo con respecto del VIH-1). El VIH-1 por su parte, tiene una mayor distribución. El grupo M del VIH-1 fue el que se adaptó con mayor éxito al hospedero humano y se dispersó por todo el mundo, es el conocido como virus pandémico (28–30).

La similitud entre los genomas del VIH-1 y el VIH-2 es de entre 40-50%. Aunque genéticamente son parecidos y ambos ocasionan una enfermedad clínicamente indistinguible; el VIH-2 se diferencia del VIH-1 por su progresión más lenta a Sida, por ser menos citopático, menos virulento, por tener una menor eficiencia de transmisión, y por estar asociado con una baja replicación viral (17,28).

De acuerdo con Rivera-Morales en 2001 (30), el VIH-1 B es el predominante en México, Estados Unidos de América y algunas regiones de América Latina; aunque en años recientes se han detectado casos esporádicos de otros subtipos como el A, C, F y H (28,31,32). Por ejemplo, en Perú en el periodo de 2008-2010, se detectaron casos de VIH-1 subtipo A, C y H (31). En países como Paraguay, Venezuela, Brasil, Colombia y Ecuador también se han detectado casos esporádicos de VIH-2 subtipo C y F (28,29).

El VIH-1 subtipo B predomina en regiones geográficas donde las vías de transmisión son principalmente a través del contacto sexual de hombre con hombre y del uso de drogas

inyectables. En cambio, los subtipos no B predominan en regiones donde prevalece la transmisión sexual de tipo heterogéneo (28,30).

Debido a que cada nuevo virión de VIH contiene dos copias de ARN, la recombinación homóloga puede llevarse a cabo entre éstas cuando una célula es coinfectada con dos subtipos de VIH. Este mecanismo ocurre de manera natural y se manifiesta en individuos infectados con VIH que viven en regiones donde co-circulan múltiples variantes virales (29,31).

2.5 Características de la infección.

La evolución típica de los marcadores virales y del hospedero en la infección por VIH se detallan en la figura 7.

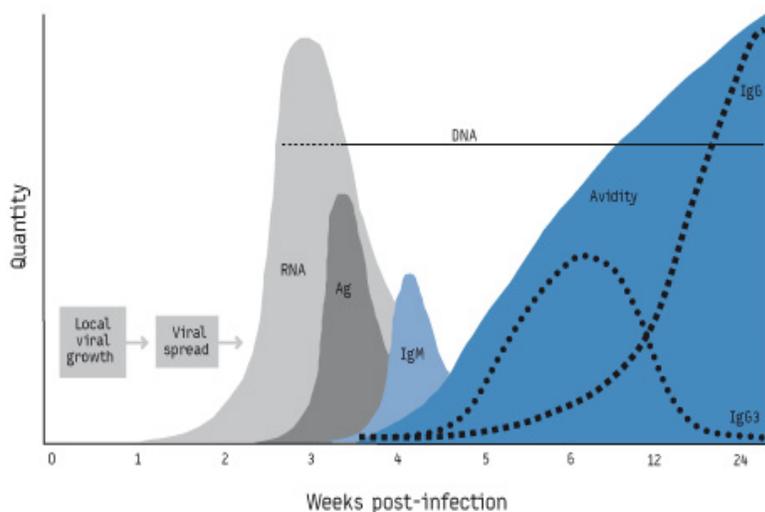


Figura 7. Evolución de los marcadores virales y serológicos durante las primeras semanas post-infección con VIH-1 (33).

La evidencia experimental indica que, el primer paso de esta evolución es la replicación local del virus en el sitio de inoculación (33). En este paso se presenta una viremia alta, generalmente durante la segunda o tercera semana post-exposición. Estos títulos altos de viremia permiten una diseminación viral en tejidos susceptibles adyacentes. El primer biomarcador presente es el ARN viral, el cual se encuentra en gran cantidad en el

individuo infectado aún antes de que sea posible detectar anticuerpos anti-VIH (su mayor elevación se da aproximadamente en la tercer semana post-infección); es por esto que es un marcador poderoso de infecciones recientes (33).

Aún en presencia de ARN viral, una proteína componente del *core* viral, el antígeno p24 (p24Ag), es usualmente detectable unos pocos días después del inicio de la viremia (aproximadamente a las 2.5 semanas). Debido a que el sistema inmune del hospedero inicia una respuesta, los niveles de p24Ag decrecen aproximadamente en 1.5 semanas. El antígeno p24 usualmente permanece indetectable hasta la degradación del sistema inmune asociado con la progresión de VIH a Sida, alrededor de los 10 años. La detección de p24Ag en ausencia de anticuerpos anti-VIH podría ser usada como un marcador de infección reciente; sin embargo, su presencia es muy corta y por tanto su aplicación es limitada. La presencia de p24Ag y/o un alto nivel de ARN viral después del periodo de seroconversión son indicativos de una progresión rápida a Sida y un mal pronóstico (33).

La respuesta inmune inicial es típicamente representada por el desarrollo de los anticuerpos clase IgM como respuesta primaria al virus. Esta respuesta es variable tanto en intensidad como en duración, generalmente inicia en la semana 3.5 y tiene su declive en la semana 5 (33).

Al mismo tiempo que los anticuerpos clase IgM, se inicia una respuesta inmune secundaria mediante el desarrollo de anticuerpos clase IgG. Un incremento gradual en el título de estos anticuerpos ocurre durante varios meses; esta es la base de algunos ensayos serológicos que presumiblemente distinguen a las infecciones recientes: ensayos sensibilidad disminuida (*detuned*), ensayos de avidéz y ensayos de diferencia de proporciones (33).

La patogénesis de la infección por VIH es un proceso crónico que implica una generación elevada y constante de viriones, acompañada de la destrucción progresiva de los linfocitos T CD4⁺. El indicador más importante de la progresión de la enfermedad es la cuenta de células CD4⁺, ya que a medida que disminuyen en la sangre la carga viral (CV) aumenta

(17) (Figura 8).

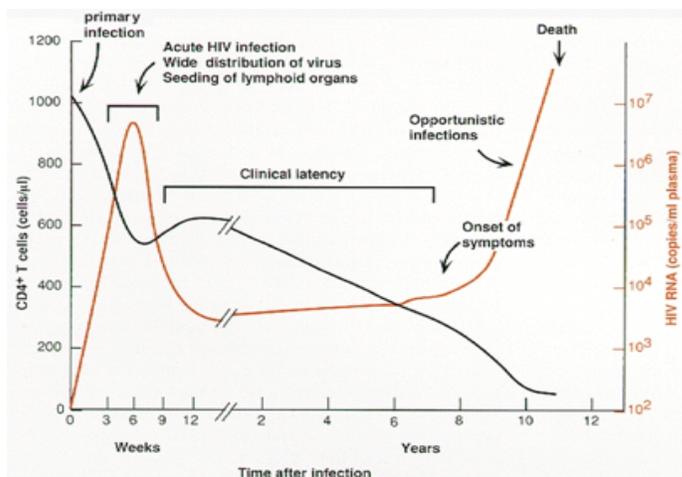


Figura 8. Evolución clínica típica de la infección por VIH. En general, las cuentas de células T CD4⁺ declinan y la carga viral se incrementa (34).

La infección primaria por VIH se caracteriza por un síndrome tipo Mononucleosis que aparece aproximadamente 3-6 semanas post-infección. La severidad y persistencia de los síntomas varía considerablemente entre individuos, aunque entre 50-70% de los individuos infectados recuerdan haber padecido los síntomas. Un declive significativo en los niveles de linfocitos T CD4⁺ en sangre periférica ocurre entre la semana 2-8 post-infección. Estos niveles regresan a lo normal a medida que el individuo entra a la fase clínica de latencia (17,34).

El síndrome agudo asociado a la infección primaria por VIH, es acompañado por un incremento acelerado de la replicación viral, y puede ser detectado en sangre alrededor de la semana 3 post-infección. Es en esta misma etapa en la que se genera un establecimiento del virus en órganos linfoides (34). La tercera etapa clínica de la infección se conoce como periodo de latencia y se caracteriza por pocas o ninguna manifestación sintomática. En esta etapa se mantienen intensas durante años las respuestas celulares y humorales frente al VIH; sin embargo, la destrucción de los linfocitos T CD4⁺ conlleva a una incapacidad progresiva del sistema inmune para contener la replicación viral (17,21,34).

Después de 2 a 15 años en promedio, se presenta una inversión de la cuenta de células T CD4⁺ (decremento) y la carga viral (incremento). Esta etapa se conoce como enfermedad clínica o Sida, y su principal característica es una cuenta de células T CD4⁺ por debajo de 400 cel./mL. Es la etapa donde más síntomas se presentan, debido al sistema inmune debilitado. A medida que se sigue estableciendo la proporcionalidad inversa de células T CD4⁺ y carga viral, se presentan las infecciones oportunistas y generalmente el individuo muere a causa de estas. Los signos y síntomas en cada etapa clínica tiene generalidades que pueden o no presentarse en los individuos infectados (17,34) (Tabla 3).

Etapa	Características
Infección primaria	Síndrome tipo Mononucleosis: fiebre, malasia, faringitis, linfadenopatía, cefalea, artralgias, diarrea, rash maculopapular y meningoencefalitis.
Latencia clínica	Raro, pero puede presentar: fatiga, pérdida de peso, linfadenopatía generalizada, y aftas.
Enfermedad clínica	Células T CD4 ⁺ (200-500 cel./mL): linfadenopatía generalizada, lesiones orales, reactivaciones de H. zóster, trombocitopenia, <i>Molusco contagioso</i> , carcinomas de piel, cefalea, condilomas, reactivaciones de <i>M. tuberculosis</i> .
* Células T CD4 ⁺ < 200cel./mL	Infecciones por protozoarios (ej. <i>P. jirovecii</i>) Infecciones bacterianas (ej. <i>T. pallidum</i>) Infecciones fúngicas (ej. <i>C. albicans</i>) Infecciones virales (ej. CMV y VHS-2)
* Linfomas	Sarcoma de Kaposi (VHH-8), carcinoma anogenital (VPH)
*Síntomas neurológicos	Meningitis aséptica, ataxia, parestesias, neuropatías periféricas, miopatías, demencia compleja por Sida.

Tabla 3. Signos y síntomas del VIH por etapa clínica (modificado) (34).

2.6 Diagnóstico.

El diagnóstico de VIH se puede llevar a cabo mediante la aplicación de técnicas diversas. Ante la sospecha de infección, se requiere de pruebas muy sensibles en las que se busquen anticuerpos contra el virus. Los principales ejemplos de estas pruebas conocidas como pruebas de tamizaje, son los ensayos tipo ELISA y las pruebas en puntos de atención (pruebas rápidas inmunocromatográficas, también conocidas como pruebas rápidas) (35).

Con respecto de los resultados obtenidos en las pruebas de tamizaje, se recomienda el uso de las llamadas pruebas confirmatorias. Estas pruebas requieren de buena sensibilidad y de una excelente especificidad. La prueba confirmatoria por excelencia es el *Western Blot* (33,36,37).

Un último grupo, son las pruebas suplementarias; éstas se centran en métodos de laboratorio que permiten predecir la progresión de la infección/enfermedad y valorar el estado inmune del individuo. La cuenta de linfocitos T CD4⁺ y la determinación de la carga viral de VIH son las representantes de este grupo de pruebas. Además de utilizarse como pruebas diagnósticas, las pruebas suplementarias mencionadas se han establecido como indicadores en la infección por VIH en casos específicos, como en embarazadas o VIH congénito (21,33,36,37).

Se han desarrollado también técnicas diagnósticas basadas en la detección simultánea de antígenos y anticuerpos, éstas son conocidas como ensayos de cuarta generación o ensayos de quimioluminiscencia. La sensibilidad y especificidad de estas pruebas para detectar antígenos y anticuerpos es alta, por encima del 99%. Aún así, la norma vigente en México establece que un resultado reactivo debe ser confirmado por el estándar de oro: *Western Blot* (38,39).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la ONUSIDA recomiendan considerar tres puntos para elegir el algoritmo más adecuado para el diagnóstico de VIH (37):

- Objetivo de la prueba.
- Sensibilidad y especificidad de las pruebas.
- Prevalencia del VIH en la población de interés.

De acuerdo con la Dirección General de Epidemiología (DGE) de la Secretaría de Salud de México, y bajo las recomendaciones de la OMS y la ONUSIDA, el diagnóstico de VIH debe realizarse primero por pruebas de tamizaje tipo ELISA o pruebas rápidas, y confirmarse con *Western Blot*. El resultado de las pruebas de tamizaje debe denominarse como reactivo o no reactivo, y nunca deberá ser considerado como una prueba única ni

confirmatoria para el diagnóstico de infección por VIH (37).

El algoritmo clase III, que es el utilizado en México, se recomienda para poblaciones donde la prevalencia de VIH en población general es menor o igual al 10% en personas asintomáticas. En este algoritmo, se requieren tres pruebas: dos de tamizaje y una confirmatoria. En México la prevalencia de la infección en población general oscila alrededor del 1%. Sin embargo en grupos de mayor vulnerabilidad la prevalencia puede elevarse hasta un 15% (37).

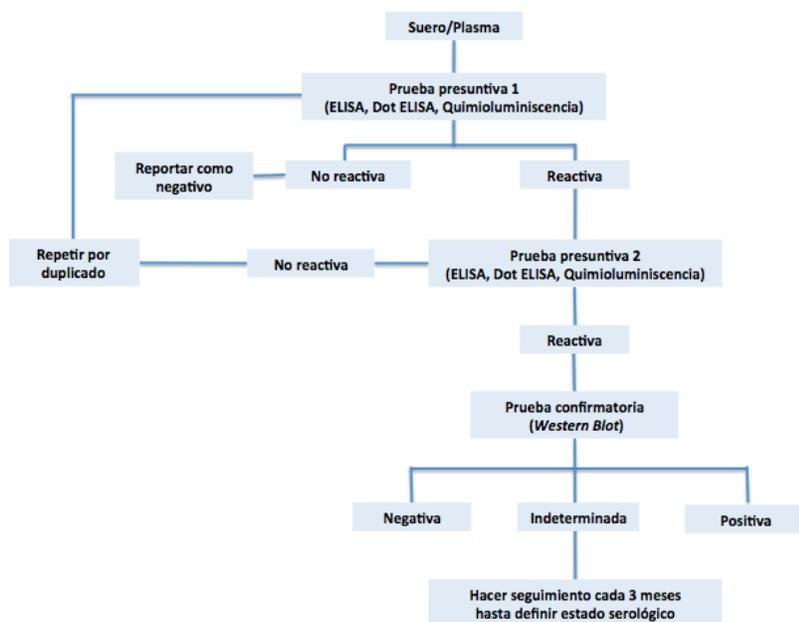


Figura 9. Algoritmo para el diagnóstico serológico de infección por VIH (adaptado) (37).

Desde hace algunos años se han desarrollado una variedad de ensayos serológicos capaces de diferenciar las infecciones por VIH recién adquiridas de las prevalentes o establecidas, estas son pruebas para diagnóstico poblacional. Estos ensayos se basan en la evolución de la infección y en la maduración de la respuesta inmune ante la misma (33,40). El algoritmo de pruebas para infecciones recientes o *RITA* por sus siglas en inglés (*Recent Infections Testing Algorithm*), es un término acuñado desde 2009 por la OMS para referirse a las combinaciones de ensayos de laboratorio y de información clínica que

permitirían el diagnóstico de infecciones, pero sobre todo su diferenciación en infecciones recientes (teóricamente incidentes) de las prevalentes (41–43).

Los *RITA* se distinguen por identificar infecciones que ocurren en un periodo no mayor a 1 año antes de la toma de la muestra, lo que permite estimar la incidencia de manera retrospectiva, siempre y cuando se conozca el tamaño de la población base (*n*). Además de calcular la incidencia en un punto específico, esta metodología permite monitorear el impacto de intervenciones de salud pública, factores demográficos o patrones de comportamiento relacionados con la infección por VIH. Generalmente, los *RITA* para VIH han incluido información clínica, y pruebas serológicas; tales como, ensayos de sensibilidad disminuida (*detuned*), ensayos de diferencia de proporciones y ensayos de avididad (43).

El uso de *RITA* con ensayos basados exclusivamente en serología no siempre resulta tan preciso. Este tipo de ensayos podrían sobreestimar la incidencia de VIH debido a que algunos individuos con infecciones establecidas o prevalentes son clasificados como infecciones recientes. Algunas de las razones por las cuales esto sucede son el subtipo de VIH, las variaciones en la cantidad de anticuerpos durante cada fase de la infección y el uso de terapia antirretroviral. Es por ello que los algoritmos *RITA* deben complementarse con técnicas moleculares o basadas en la secuencia genómica del virus (33,42–44).

La diversidad genética del VIH se ha propuesto como biomarcador de temporalidad de infección. Esta se puede utilizar para determinar infecciones recientes, debido a que el tiempo de infección es proporcional a la diversidad. Algunas de las técnicas moleculares más utilizadas para este propósito son las basadas en PCR en tiempo real (qPCR), de donde deriva el ensayo conocido como *high-resolution melting (HRM)*, y otros como la secuenciación del genoma viral (5).

La base metodológica del *HRM* es amplificar una región específica del genoma de VIH, seguidamente amplificar una región más pequeña mediante un PCR anidado con uso de un marcador fluorescente, y por último recoger y analizar los datos de fluorescencia vs

temperatura durante la fusión del amplicón (5,6,45). El ancho de la curva de disociación resultante permite calcular un *score* específico para la muestra y con ello hacer comparaciones con patrones establecidos. Distintos patrones de *scores* están asociados con diferentes fases de la infección por VIH, es por ello que la diversidad genética determinada con este ensayo puede ser útil para detectar infecciones recientes (5,6,46).

Por su parte, la secuenciación del genoma de VIH se ha llevado a cabo mediante diversas técnicas, tales como la secuenciación simple del genoma, la secuenciación tipo Sanger, la secuenciación masiva, entre otras (8,38,39,47). El principio de este enfoque es la diversificación existente en la secuencia genómica del VIH a lo largo de la infección. Los resultados de la secuenciación se interpretan de tal manera que, la presencia de una proporción baja de cuasiespecies es indicativa de que la población viral ha replicado recientemente y evolucionó de un único o de múltiples variantes virales de transmisión, como es el caso de las infecciones recientes. En etapas avanzadas, las cuasiespecies virales dentro de un individuo en su mayoría difieren como consecuencia de una acumulación de mutaciones por errores de la transcriptasa reversa y la selección inmune, que es el caso de las infecciones establecidas o prevalentes (8,38,39,47).

Aunque las técnicas moleculares siguen siendo más costosas con respecto de las pruebas serológicas, el desarrollo de un algoritmo tipo *RITA* para determinar infecciones recientes por VIH que además de la serología incluya técnicas moleculares tiene el propósito disminuir la proporción de infecciones falsas recientes (la recomendación es <2%), lo que aumentaría la certeza de la determinación. Esto cobra especial importancia en el caso de poblaciones de alto riesgo (por ejemplo HSH), donde la prevalencia es alta. Además, un *RITA* con ambas técnicas podría representar una estrategia alternativa y actual para el cálculo de la incidencia de VIH, para el diagnóstico poblacional de dichas infecciones, sin la necesidad de un seguimiento de la población de estudio (43,48).

2.7 Tratamiento.

El VIH se puede tratar mediante una terapia múltiple de fármacos antirretrovirales (ARV).

Aunque este tratamiento no es curativo, el objetivo es controlar la replicación viral en el individuo infectado y contribuir al fortalecimiento inmunológico (4,49–51). A medida que el acceso al tratamiento antirretroviral (TARV) mejore, la población infectada por VIH continuará aumentando debido a la disminución de la tasa de mortalidad por Sida o sus causas relacionadas. El TARV está recomendado para todas las personas que viven con VIH, independientemente de la cuenta de células T CD4⁺ y de la presencia o no de síntomas; esto con el objetivo de reducir el riesgo de progresión de la enfermedad y prevenir la transmisión del virus (52).

El VIH produce morbilidad y mortalidad por tres vías: la inmunodeficiencia; el daño directo a ciertos órganos blanco; y, de manera indirecta, el daño a estos órganos por la inflamación crónica producida por el propio virus. Los estudios realizados hasta ahora muestran que el VIH activo puede dañar al organismo en cualquier etapa de la infección, que la TARV es benéfica aún en etapas avanzadas, y que el inicio temprano de la TARV puede evitar el daño producido por la replicación viral al inicio de la infección (53,54).

Las guías actualizadas de TARV (2018 y 2018) promueven con énfasis la conducta de diagnosticar y tratar lo más temprano posible. El propósito es el de aumentar el diagnóstico, la captación, tratamiento y retención de las personas infectadas a las personas que viven con el virus. Sin embargo, el tiempo de inicio del tratamiento en pacientes infectados con VIH es variable debido a que las herramientas de diagnóstico útiles durante la seroconversión generalmente se realizan de forma limitada, y con frecuencia el diagnóstico es tardío en estadios avanzados de la enfermedad, cuando se presentan síntomas. Además de lo anterior, desafortunadamente la aplicación heterogénea de las metodologías diagnósticas y tratamiento depende también de diferentes variables de índole no biológica (53,54).

Los ARV actúan inhibiendo (de forma competitiva o no competitiva) el mecanismo de una enzima (RT, In y Pr) o etapa importante para el ciclo de replicación viral (fusión del virus). Existen 30 diferentes ARV aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) para el tratamiento del VIH. Estos fármacos tienen como blanco cuatro diferentes pasos en la

replicación viral (25) (Figura 10):

Inhibidores de fusión: la entrada del VIH a la célula hospedera involucra la interacción con la glicoproteína gp120 (fusión) con los correceptores CCR5 o CXCCR4 (unión a coreceptores); esta acción desencadena la formación de dos secuencias repetidas (HR-1 y HR-2) en la glicoproteína gp41 a una estructura 6 alfa-helice, que permite la aproximación y fusión de la célula y la membrana del virus. Los inhibidores de fusión bloquean la formación de la estructura 6 alfa-helice que es necesaria para la fusión. Ejemplo de fármacos inhibidores de fusión son el maraviroc y el enfuvirtide.

Inhibidores de la transcripción reversa: Estos fármacos tienen como blanco la transcripción reversa. Se distinguen dos clases dentro de este grupo: los inhibidores nucleósidos de la transcriptasa reversa (NRTIs) y los inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa (NNRTIs). Los **NRTIs** (por ejemplo azidotimidina) son estructuralmente similares a los nucleótidos de los ácidos nucleicos (DNA y RNA), pero difieren de sus análogos naturales en el reemplazo del grupo hidroxilo en la posición 3', por otro grupo que es incapaz de formar el enlace fosfodiéster 5' a 3' esencial para la elongación del DNA. Estos ARV bloquean la actividad de la transcriptasa reversa al competir con los sustratos naturales e incorporándose en el DNA viral, por tanto actúan como terminadores de cadena en la síntesis de DNA proviral. Los **NNRTIs** (por ejemplo nevirapina) se unen de forma directa o no competitiva a la enzima transcriptasa reversa. Cada uno de estos antirretrovirales difiere químicamente, pero todos se unen a un sitio que es distinto del sitio de unión del sustrato. Actúan bloqueando la actividad de la DNA polimerasa mediante el cambio conformacional y el rompimiento del sitio catalítico de la enzima. Sólo tienen actividad contra el VIH tipo 1.

Inhibidores de la integrasa (INSTIs): estos fármacos bloquean la actividad de la integrasa, la cual es requerida para la inserción del DNA viral en los cromosomas de la célula hospedera. Un ejemplo de este grupo es el raltegravir.

Inhibidores de la proteasa (IP): La proteasa posee un sitio activo responsable de la

división de la poliproteína precursora en cadenas más pequeñas, con el fin de producir las proteínas funcionales que permiten la maduración del virión. La inhibición de la proteasa resulta en la liberación de partículas virales estructuralmente desorganizadas y no infecciosas para otras células blanco, debido a que los viriones no pasan por la etapa de maduración. Un fármaco perteneciente a este grupo es el darunavir (55).

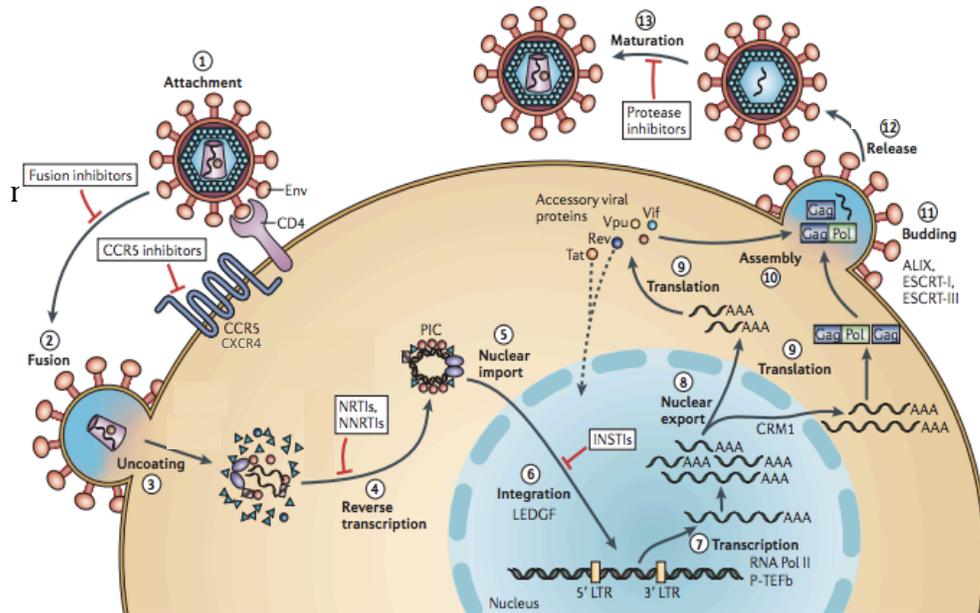


Figura 10. Grupos de fármacos antirretrovirales y su sitio de inhibición en el ciclo de replicación viral (modificado) (25).

El éxito del TARV puede verse seriamente afectado por la prevalencia de resistencia transmitida a ARV (TDR, del inglés *transmitted drug resistance*), término referente a aquellas mutaciones virales que modifican su secuencia otorgándole resistencia ante ciertos fármacos ARV, y que se presenta en individuos sin terapia antirretroviral previa (56–58).

La prevalencia de TDR tiene importantes implicaciones para el manejo óptimo de la TARV y también incrementa el riesgo de fallo en el tratamiento, lo cual influye de manera negativa en la calidad y esperanza de vida del individuo infectado (33,37). Así mismo, la vigilancia y monitoreo de TDR a nivel poblacional es parte crucial para el manejo de

recursos de salud pública, sobre todo recursos económicos destinados a la adquisición de fármacos ARV. Además, determinar la prevalencia de TDR en poblaciones recientemente infectadas esclarece mejor la resistencia circulante y permite predecir tendencias futuras (56–58).

Por ejemplo, un estudio previo de representación nacional realizado en 25 clínicas de salud en México encontró hasta 15.5% de resistencia a antirretrovirales pre-tratamiento (ante cualquier fármaco ARV), y 10.6% de resistencia pre-tratamiento a fármacos NNRTIs. Lo anterior utilizando secuenciación tipo Sanger. Al utilizar secuenciación de nueva generación estos hallazgos disminuyen, 14.4% y 9.8%, respectivamente. A pesar de esta disminución y después de un análisis multivariado, los autores concluyen que en las personas con resistencia pre-tratamiento a los NNRTIs se reduce de manera significativa la efectividad del TARV de primera línea; lo que resalta la necesidad de un diagnóstico inicial de resistencia a ARV en las personas que inician el TARV (59).

A partir de 1996, se inició el uso de la terapia antirretroviral de alto impacto (*HAART*, por sus siglas en inglés). La *HAART* es una combinación de ARV que bloquean diferentes pasos del ciclo de replicación viral. Rutinariamente se compone de un NRTI, un NNRTI y un IP, esto ya sea en una sola píldora o en varias. El uso de estas terapias múltiples disminuye de manera significativa la probabilidad de seleccionar cuasiespecies mutantes resistentes a los ARV, las cuales surgen de manera rápida en las monoterapias (25,31).

La *HAART* ha tenido un efecto notable en la evolución de la infección por VIH. Con el uso de esta terapia, lo que antes era una enfermedad fatal se transformó en un padecimiento crónico estable. Sin embargo, elegir el mejor esquema de tratamiento de la infección por VIH es un tema muy debatido; debido a que tiene sus ventajas e inconvenientes ya que la decisión de ello debe estar relacionada con diversos factores como el tipo de medicamento a suministrar, el costo, el momento adecuado para iniciar la terapia, antecedentes del tratamiento, conceptos de resistencia cruzada y la experiencia del médico tratante (25,52).

2.8 Resistencia a antirretrovirales.

El uso de antirretrovirales para tratar la infección por VIH, se ha visto limitada por la presencia de variantes de una cuasiespecie viral en un mismo individuo. Estas variantes permiten al VIH evadir al sistema inmune, alterar su tropismo y desarrollar resistencia a los antirretrovirales (56–58,60–62).

El VIH es genéticamente diverso dentro y entre individuos infectados. La alta tasa de replicación viral, el tamaño de la población viral en cada individuo y la recombinación contribuyen a la variación genética. Sin embargo, la causa primordial de la diversificación del VIH son las mutaciones que se generan durante la replicación viral (58,62).

El desarrollo de cuasiespecies virales es rápido y se da en gran cantidad desde un número limitado de partículas virales; esto representa una de las bases de la diversificación del VIH. Esta diversidad genética es uno de los mayores obstáculos para la erradicación del VIH. Las cuasiespecies virales son capaces de responder rápidamente a la presión selectiva que impone el sistema inmune y la terapia antirretroviral; y así mismo, son capaces de frustrar los esfuerzos en el desarrollo vacunal. Sólo dos únicas características de la replicación viral son responsables por la variación genética durante la infección: las mutaciones y la recombinación viral (60).

En primer lugar, las mutaciones que son frecuentemente introducidas en el genoma viral por errores propios de las enzimas que participan en la replicación. Existen 3 polimerasas que participan en la replicación viral y que contribuyen con las mutaciones: del hospedero la DNA polimerasa (DNApol) y la RNA polimerasa II (RNApol II), y del virus la transcriptasa reversa (RT). Hay evidencia que sustenta que la fidelidad de la DNApol junto con su maquinaria de edición (acción exonucleasa), es significativamente alta con respecto de la RNApol II y la RT. La tasa de mutación reportada para la DNApol es de entre 1×10^{-9} y 1×10^{-12} mutaciones/pb/ciclo (60,61).

Muchas de las células infectadas mueren antes de dividirse, entonces sólo la RNApol II y la RT tienen una contribución significativa a los errores cometidos durante la replicación.

Aunque todas las mutaciones que ocurren en la replicación son comúnmente atribuidas a la RT, la contribución relativa de la RT y la ARNpol II a la tasa de errores total aún no está bien definida. Aún con esto, se asume que todos los errores son cometidos por la RT. La fidelidad *in vivo* de la RT de VIH es en promedio de 1.4×10^{-5} mutaciones/pb/ciclo, la cual es razonablemente buena para una enzima que carece de función de edición, y es similar a la tasa promedio reportada para otros retrovirus (1.5×10^{-5} mutaciones/pb/ciclo) (61,62).

Además de las mutaciones, la otra característica que eleva la variabilidad genética del VIH es la recombinación viral. La RT de VIH puede utilizar como molde las dos copias del genoma viral (ARN) co-empacado como dímero, dando paso a la recombinación viral. Cuando los ARN virales co-empacados son genéticamente diferentes, la recombinación viral puede dar lugar a mutaciones entre los genomas virales en las cuasiespecies. Esto es debido a que la RT al usar como molde ambas cadenas, se acopla a ellas y puede ir cambiando de una a otra; lo que resulta en una secuencia quimera o secuencia recombinante de DNA (26,60,61,63).

La resistencia es un fenotipo o característica del crecimiento del virus, que se encuentra alterado como resultado de un cambio en el genotipo del mismo. Como se mencionó con anterioridad, los cambios en el genotipo del virus se deben principalmente a mutaciones. La resistencia a antirretrovirales puede definirse como cualquier cambio en la estructura viral que favorezca su replicación en presencia de niveles terapéuticos de uno o más fármacos antirretrovirales. Este fenómeno de resistencia puede darse incluso antes de usar un fármaco ARV. A esto último se le conoce como resistencia transmitida a ARV (TDR), y ocurre cuando el virus infectante (en el individuo con infección reciente) ya posee en su genoma una mutación que le confiere resistencia a uno o más fármacos ARV, a pesar de no haber estado sometido a un TARV. La TDR ha sido una constante amenaza para la eficacia en el tratamiento del VIH. La transmisión de estas cuasiespecies resistentes es común en la mayoría de los países donde se usa ampliamente la TARV (60–62,64).

El número de mutaciones necesarias para generar resistencia y la rapidez con que éstas aparecen depende del tipo de fármaco ARV. La resistencia a ARV es uno de los principales determinantes de la falla al control viral y su estudio es de relevancia en la selección de tratamientos iniciales, tratamientos de rescate, en la comprensión de la resistencia cruzada (entre fármacos ARV) y de la resistencia transmitida. Es por ello que, se recomienda realizar ensayos de resistencia antes de iniciar un esquema de TARV o ante un fallo terapéutico (64).

Si se reporta resistencia, este hallazgo es un buen predictor de falla si se usa el fármaco en cuestión. Si se reporta susceptibilidad, este hallazgo no garantiza que el fármaco vaya a funcionar. Lo anterior debido a la presencia de mutaciones minoritarias no detectadas ni reportadas por los ensayos de resistencia. Debido a esto, es importante tener un buen apego al tratamiento y realizar ensayos de resistencia periódicos o ante sospecha de falla terapéutica (53,64).

A este respecto, la prevención, el seguimiento y la respuesta ante la resistencia a ARV constituyen la base del Plan de Acción Mundial sobre la resistencia a los ARV, el cual es un programa liderado por la OMS que involucra a diversos países en una respuesta coordinada. México forma parte de este programa, el cual articula un consenso global comprometido con la disminución de la resistencia antimicrobiana y como parte de ello la resistencia a ARV. La finalidad es la de alcanzar las metas mundiales para el VIH, incluida una generación libre de Sida para 2030 (64).

2.9 Continuo de atención al VIH.

A nivel poblacional, como respuesta a la epidemia del VIH la cascada de atención al VIH es un marco internacional que modela las etapas dinámicas de la atención misma. La cascada de atención o también llamada continuo de atención incluye diagnóstico, vinculación con la atención (LTC), retención en la atención (RiC), adherencia a la terapia antiretroviral (ART) y supresión viral. Todas estas etapas tienen dificultades propias para ser medidas debido a su dependencia de las variables operativas y de vigilancia para cada país o

región. Sin embargo, existen acciones específicas para lograr el ideal para cada etapa (65).

En el diagnóstico, primera etapa del continuo la recomendación de los CDC es utilizar pruebas rápidas o pruebas en los puntos de reunión, así como hacer que el examen de detección del VIH sea una rutina en la atención médica general en lugar de una práctica basada en el riesgo. Actualmente, en algunos países están disponibles las pruebas caseras (65,66). Es un hecho que la supresión viral se logra más rápidamente si el tratamiento antiretroviral se inicia dentro de los tres meses posteriores al diagnóstico, por lo que la LTC (segunda etapa) se basa en no superar este período de tiempo para todas las personas diagnosticadas. Desafortunadamente, el informe del diagnóstico y las actividades de gestión para el inicio de la TAR varían en cada país e incluso en cada región. Una estrategia para facilitar la LTC es la iniciativa de buscar, probar, tratar y retener (STTR, por sus siglas en inglés) como parte de un modelo de atención al VIH que es altamente aplicable a las poblaciones vulnerables pero que requiere la colaboración de un grupo interdisciplinario (66,67).

La tercera etapa, RiC es la más discutible porque no existe un consenso acerca de la mejor medida para ello. Es una etapa cambiante porque la persona que vive con VIH (PVV) puede hacer la transición dentro y fuera de la atención a lo largo del tiempo por muchas razones, y estos cambios no siempre están documentados. Además del LTC para lograr el óptimo RiC es necesaria la coordinación entre los proveedores de servicios (66,68).

Como en la etapa anterior, para la adherencia al tratamiento antiretroviral no existe una medida ideal porque las personas en TARV pueden dejar la medicación por diversos factores y retomarla posteriormente (66,67). De hecho, es preferible considerar el autoinforme del paciente como una fotografía instantánea de los patrones de adherencia más que como un registro longitudinal. Esta medida debe interpretarse con cautela. Otro punto discutible, es el momento adecuado para prescribir el tratamiento antiretroviral. Mientras que, en algunos países esta acción es inmediata; en otros, es necesario verificar primero el recuento de células T CD4⁺. Es recomendable priorizar el tratamiento

inmediato debido a la evidencia sobre el costo y los beneficios de la supresión viral (66).

La última etapa es el objetivo principal del continuo de atención del VIH, alcanzar la supresión viral a través de la terapia antiretroviral. El CDC considera la supresión viral si la carga viral más reciente es inferior a 200 copias/ml (66). El punto de corte de la carga viral es diferente entre países, principalmente debido a sus recursos, la tecnología para medirla y la transición del paciente entre estados suprimidos y no suprimidos a lo largo del tiempo. Para lograr este objetivo, los proveedores de VIH deben trabajar para vincular y retener a los PVV en la atención (66,67).

El modelo continuo condiciona un enlace directo y unidireccional entre las etapas, por lo que el éxito o el fracaso en una etapa influye en las sucesivas. En los países con epidemias concentradas de VIH, las estimaciones por etapas se basan en estudios o encuestas en poblaciones vulnerables. La prevalencia, la incidencia, el diagnóstico, la cobertura de TARV y la mortalidad son medidas vinculadas de alguna manera al continuo de atención del VIH (65,66).

La relación entre las variables como la incidencia y la prevalencia está influenciada por la medida estimada en cada etapa del continuo, las cuales representan la dinámica propia de la epidemia de VIH por región y en cada población específica; posiblemente debido a que la medición de las etapas y la aplicación del continuo varía en cada región (66). Estas medidas podrían aumentar o disminuir en respuesta a otras variables, entre las que destaca la mortalidad (69,70). Por ejemplo, las regiones donde la prevalencia es alta pero la incidencia es baja están relacionadas con una baja tasa de mortalidad. En contraste, en regiones con baja prevalencia y alta incidencia, se observa que la mortalidad es alta o que existe movilidad de la población. Al considerar el tipo de población, las personas con comportamientos sexuales de alto riesgo exhiben dinámicas más complejas; tal es el caso de los HSH (15).

2.10 Transmisión del VIH.

El VIH es el agente causal de una enfermedad infecciosa de propagación directa: el Sida.

Esto quiere decir que la transmisión ocurre desde el individuo infectado al individuo susceptible a través de secreciones, del contacto con la piel, mucosas o tejidos (71).

Las vías de transmisión del VIH son las siguientes (72):

- Sexual: caracterizada por la exposición directa a secreciones de personas infectadas. Estas secreciones pueden ser el semen y/o las secreciones vaginales. Esta es la más común.
- Perinatal: se trata de la transmisión de una madre infectada a su producto, ésta también se conoce como transmisión vertical. A su vez, esta vía de transmisión se divide en tres rubros: transmisión durante el embarazo, durante el parto (al paso del producto por el canal vaginal) y durante la lactancia.
- Sanguínea: por la exposición a sangre infectada o sus derivados, ya sea por transfusiones y transplantes, o por vía parenteral debido al uso de agujas contaminadas.

La transmisión está directamente influenciada por variables biológicas y de comportamiento que se conocen como “variables proximales”, justamente porque inciden propiamente en el fenómeno de interés e impactan a un nivel individual. Un ejemplo de éstas son los factores biológicos y de causal genético, o los estilos de vida. A su vez, estas variables son influenciadas por variables de cobertura más amplia como la desigualdad en la distribución de la riqueza, las condiciones de trabajo, la escolaridad, o las condiciones culturales; éstas se conocen como “variables distales” (73). Las variables distales se asocian a niveles de grupo y sociedad, es decir, a niveles poblacionales. Por tanto, las variables distales que contienen a las proximales, tienen el potencial para alterar la influencia de estas últimas en la transmisión de una infección. Por ejemplo, el patrón de contactos sexuales dentro de una población es el mismo para cada infección de transmisión sexual (ITS), pero la habilidad de la infección de explotar esos contactos estará determinada por su distribución y dependerá de su propia biología (73–75).

La transición de ser un individuo susceptible (no infectado) a ser un individuo infectado, obedece a distintos factores o variables, según sea la infección de en estudio. De manera general, el modelo más utilizado para explicar esta transición es el conocido como número básico de reproducción o R cero (R_0). El R_0 es una medida del potencial para la propagación o transmisión de una infección. En el contexto de las ITS, como es el caso del VIH, se puede definir como el número promedio de infecciones causadas por un individuo infeccioso en una población totalmente susceptible (73,74).

El R_0 tiene tres componentes clave que se pueden describir desde la perspectiva de las ITS: la probabilidad de exposición de un susceptible a un infectado (c), la eficiencia de la transmisión sexual cuando la exposición ocurre (β), y la duración promedio de la infectividad de los individuos infectados (D). Los dos últimos componentes dependen de factores biológicos del agente infeccioso y del hospedero, mientras que la exposición de un susceptible a un infectado (c) depende de factores demográficos. Debido a lo anterior, la fórmula para obtener el número básico de reproducción es la siguiente (74):

$$R_0 = c * \beta * D.$$

La probabilidad de transmisión del VIH varía enormemente entre grupos poblacionales, y depende de la presencia de otras variables. Sin embargo, se ha evidenciado que el riesgo de transmisión es mucho más alto en HSH, con respecto del riesgo de transmisión en heterosexuales. El riesgo asociado con una variable particular de comportamiento, depende de la prevalencia de la infección dentro de los contactos, los cuales a su vez dependen de los comportamientos en la población. Esto puede ilustrarse desde la definición de grupo “core”. El grupo *core* es el referente a aquellos individuos con múltiples parejas sexuales y con comportamientos de riesgo, que pueden manejar o dirigir la incidencia de una ITS en la población. La existencia de este grupo es la base para mantener la transmisión de la infección en la población total o general. De esta manera, se puede concluir que para la transmisión de una ITS el número de contactos es tan importante como los comportamientos en la población (63,73,74).

Como ya se ha mencionado, el riesgo de transmisión del VIH depende del tipo de exposición y se puede aumentar o disminuir ante la presencia de diferentes factores o variables. En la tabla 4, se muestran algunos datos que estiman la probabilidad de adquirir VIH de acuerdo con la naturaleza de las prácticas sexuales o por vía parenteral (76).

TIPO DE EXPOSICIÓN	RIESGO POR 10,000 EXPOSICIONES
Parenteral	
Transfusión sanguínea	9, 250
Agujas compartidas durante el uso de drogas	63
Percutánea (pinchazo de aguja)	23
Sexual	
Coito anal receptivo	138
Coito anal insertivo	11
Coito vaginal receptivo	8
Coito vaginal insertivo	4
Sexo oral receptivo	Mínimo
Sexo oral insertivo	Mínimo

Tabla 4. Probabilidad estimada de adquirir VIH de un individuo infectado por tipo y acto de exposición (modificado) (76–78).

Además del riesgo de transmisión por vía de exposición o por tipo de acto sexual, existen otras variables que pueden reducir o aumentar la transmisión del VIH (56–59). Por ejemplo, en un individuo infectado el uso de ARV reduce hasta un 96% el riesgo de transmitir el virus y el uso consistente del condón lo reduce hasta en 80%. De manera contraria, un individuo que vive con VIH y que además está coinfectado con otra ITS tiene un riesgo mayor de transmitir el virus; al igual que aquellos individuos que viven con VIH y que tienen una carga viral alta (49,76,78,79).

En un enfoque poblacional, la comprensión de la dinámica de transmisión del VIH desde un individuo infectado a otros individuos susceptibles en esa misma población, implica la consideración de diversos parámetros (80) (Figura 11). Ejemplo de ellos son la prevalencia e incidencia del VIH en la población, los comportamientos y prácticas sexuales, la red de relaciones entre individuos, la infectividad del individuo que vive con VIH, la cascada de atención (acceso a diagnóstico, diagnóstico oportuno, acceso a fármacos ARV, adherencia

al tratamiento y supresión viral), entre otros. Es por todo esto, que el entender las causas de los patrones de comportamiento, es la clave para entender la transmisión de las infecciones, y para el desarrollo y aplicación de intervenciones (80,81).

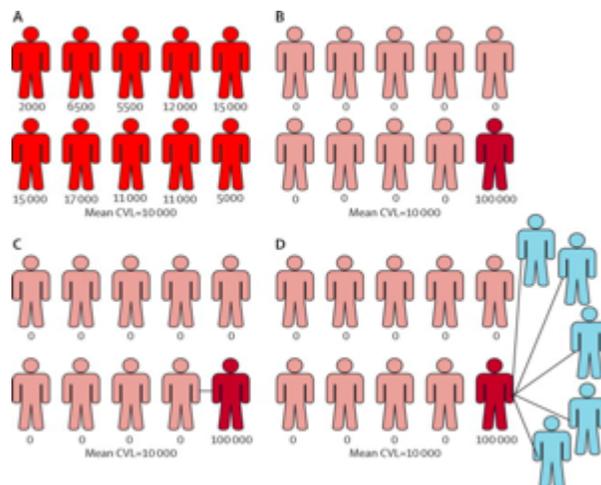


Figura 11. Representación de poblaciones con idénticas prevalencias de VIH y cargas virales comunitarias (CVC), pero con diferente potencial de transmisión. A) CV distribuidas entre 2,000 y 20,000; B) CV < 50 en 9 personas y CV de 100,000 en la décima persona; C) Población B con un individuo que tiene CV alta y que está en una relación monogámica con un individuo infectado con VIH (pero que es un individuo suprimido, CV < 50); D) Población B con un individuo con CV alta y que está en relaciones múltiples con individuos no infectados (80).

2.11 Epidemiología.

La prevalencia de VIH es una medida de las personas que viven con la infección. La prevalencia mundial estimada para el año 2018, resultó de 37.9 [IC95% 32.7-44.0] millones de infectados. A diferencia de la prevalencia, la incidencia de VIH es una medida del número de nuevas infecciones. A nivel mundial para el mismo año (2017) se encontraron 1.7 millones de nuevas infecciones [IC95% 1.4-2.3]. Desde 2010, las nuevas infecciones por VIH en adultos descendieron alrededor de un 16%, desde 1.9 millones hasta 1.6 millones en 2017. Igualmente, para 2017 940,000 [670,000-1.3 millones] personas fallecieron a causa de enfermedades relacionadas con el Sida (82).

Los datos presentados son referentes a la población general. Sin embargo, la incidencia ha ido en aumento en grupos considerados de alto riesgo, como son los HSH. En este grupo,

el riesgo de contraer el VIH es 27 veces mayor con respecto de la población general (82).

En México, las estimaciones de prevalencia de VIH en población general se han llevado a cabo con el uso de estudios transversales. En 1987 se realizó la Encuesta Nacional Seroepidemiológica (83), en hombres mayores de 15 años; en ésta se encontró una seroprevalencia de 0.036%. Para el año 2000, se desarrolló la Encuesta Nacional de Salud (ENSA 2000) (84) en población mayor de 20 años, donde se encontró una prevalencia de 0.25% (IC 95% 0.14-0.45%). Finalmente, para el año 2012 se llevó a cabo la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANut 2012), de la cual se determinó una seroprevalencia de VIH de 0.15% (IC 95% 0.09-0.21%) (85).

La evidencia sugiere que en México, la seroprevalencia de VIH se ha mantenido relativamente estable entre los años 2000 y 2012; con base en la ENSA 2000 y la ENSANut 2012 (84,85). Por otro lado, de acuerdo a la vigilancia epidemiológica de casos de VIH/Sida en México y el registro nacional de casos de Sida, para el primer trimestre de 2019 se reportaron 167, 787 casos de VIH y 2, 920 casos nuevos de VIH notificados en ese periodo (86).

México presenta una epidemia de VIH concentrada, principalmente en personas con comportamientos sexuales de riesgo. En encuestas locales se han encontrado prevalencias del 12-15.1% entre hombres trabajadores sexuales (HTS), 10% en HSH, 7% en usuarios de drogas inyectables y 1% en mujeres trabajadoras sexuales (MTS). A nivel nacional, para el año 2011 se realizó la primer encuesta nacional de VIH en HSH en sitios de encuentro. Como resultado de esta encuesta se detectó una seroprevalencia de VIH de 16.9% (14,15,85,87).

A continuación se muestra un breve resumen de diferentes encuestas sobre seroprevalencia de VIH realizadas en México entre población HSH. En la tabla se detallan estudios efectuados del año 2010 a la fecha y se reportan las prevalencias encontradas entre dicha población de estudio con diferentes pruebas diagnósticas. Es de resaltar, que a excepción de 2 estudios los demás (13) exhiben prevalencias por encima del 10% (88).

Geographic Area	Site Name	Reference Date	Population Subgroup	Sex	Age	Prevalence Rate	Virus Type	Sample Size	Specimen Type	Test Type	Source ID	Comments
Seven cities	Seven cities	2012	Homosexuals	M	ALL	12.16	HIV	1,110	BW	RAPID *2	P0682	Cities: Puerto Vallarta, Guadalajara, Ciudad Nezahualcoyotl, Ecatepec, Toluca, Veracruz, & Coahuila de Zaragoza-Minatitlan. Located in Jalisco, Veracruz, & Estado de Mexico states. Men having sex w/ men (MSM).
Mexico City	Clinica Condesa	2010	Homosexuals	M	ALL	27.60	HIV	N/A	B	UNK	M1484	Only the prevalence rate was given. Site: Clinica Condesa. VCT. Men having sex w/ men (MSM). Jan. 10.
Noroeste region	Noroeste region	2012(?)	Homosexuals	M	ALL	12.50	HIV	N/A	B	RAPID	B0971	Only the prevalence rate was given. Men having sex w/ men (MSM).
Tijuana	Tijuana	2012-2013	Homosexuals & bisexuals	M	ALL	16.40	HIV	189	B	RAPID *2, IFA	P0713	Included transgenders. Men having sex w/ men (MSM). Age 18+. Aug. 12 - May 13.
Three states	Six urban areas	2012	Homosexuals	M	ALL	13.17	HIV	1,098	B	UNK	C1505	States: Mexico, Jalisco, & Veracruz. Men having sex w/ men (MSM).
Noreste region	Noreste region	2012(?)	Homosexuals	M	ALL	13.50	HIV	N/A	B	RAPID	B0971	Only the prevalence rate was given. Men having sex w/ men (MSM).
Mexico City	Clinica Condesa mobile unit	2010	Homosexuals	M	ALL	3.80	HIV	N/A	B	UNK	M1484	Only the prevalence rate was given. Site: Clinica Condesa mobile unit. VCT. Men having sex w/ men (MSM). Jan. 10.
Centro region	Centro region	2012(?)	Homosexuals	M	ALL	20.50	HIV	N/A	B	RAPID	B0971	Only the prevalence rate was given. Men having sex w/ men (MSM).
Tijuana	Agencia Familiar Binacional Clinic	2012-2013	Homosexuals & bisexuals	M	ALL	18.32	HIV	191	BS	RAPID *2, IFA, WB	P0703	Included transgenders. Age range 18-65 yrs. Aug. 12 - May 13. Rapid test: Advanced Quality HIV.
Sur region	Sur region	2012(?)	Homosexuals	M	ALL	20.00	HIV	N/A	B	RAPID	B0971	Only the prevalence rate was given. Men having sex w/ men (MSM).
Mexico City	Condesa Specialized Clinic	2015	Homosexuals	M	ALL	19.00	HIV	15,547	BW	RAPID	R0681	Men having sex w/ men (MSM).
Not specified	Not specified	2010(?)	Homosexuals	M	ALL	10.00	HIV	N/A	B	UNK	B0859	Only the prevalence rate was given.
24 cities	24 cities	2012(?)	Homosexuals	M	ALL	17.14	HIV	N/A	B	RAPID	B0971	Only the prevalence rate was given. Recruited from 475 sites. Men having sex w/ men (MSM). Breakdown by region is provided.
Centro Occidente region	Centro Occidente region	2012(?)	Homosexuals	M	ALL	9.90	HIV	N/A	B	RAPID	B0971	Only the prevalence rate was given. Men having sex w/ men (MSM).
Not specified	Not specified	2011	Homosexuals	M	ALL	16.99	HIV	N/A	B	RAPID	C1505	Only the prevalence rate was given. Men having sex w/ men (MSM).

Tabla 5. Resumen de diferentes estudios con respecto de la prevalencia de VIH en HSH, tomado y modificado de HIV/AIDS Surveillance Data Base del United States Census Bureau (https://www.census.gov/data-tools/demo/hiv/hiv.html?s_appName=hiv&s_ccode=MX&s_popcode=H). Datos únicamente del año 2000 en adelante, se incluyen sólo prevalencias en HSH (88). RAPID: prueba diagnóstica RAPID test, WB: Western Blot e IFA: inmunofluorescencia indirecta. Referencias en la tabla: P0682 (89) , M1484 (90) , B0971 (91) , P0713 (92) , C1505 (93) , R0681 (94) y B0859 (95) .

La medición de la incidencia es un parámetro primordial para estimar la dinámica de transmisión del VIH. Un enfoque novedoso es la determinación de la incidencia a partir de estudios transversales, con el desarrollo y la aplicación de métodos de laboratorio que permiten distinguir las infecciones recientes (o conceptualmente concebidas como

incidentes) de las establecidas o prevalentes. Este enfoque es la base de los algoritmos tipo *RITA* que se han definido con anterioridad (5,33,43) (véase Diagnóstico).

En la vigilancia epidemiológica del VIH, actualmente se ha introducido el concepto de carga viral comunitaria (CVC), el cual es de gran relevancia en el diagnóstico poblacional. La CVC es un parámetro que evalúa el efecto del tratamiento en individuos infectados, y la potencial transmisión del virus en individuos con y sin tratamiento. En los individuos que no se encuentran en tratamiento se espera una medida de carga viral alta, entre estos individuos se cuentan también aquellos con infección aguda por VIH. De manera contraria, al incrementarse el uso de TARV, aumentan los individuos con supresión viral lo que origina una disminución de la CVC y en teoría se ocasionan menos casos nuevos de VIH. Sin embargo, a la fecha hay pocos datos que vinculan la incidencia de VIH con la CVC (80,81).

La CVC está ligada a la cascada de atención, esta última comienza con los individuos diagnosticados con VIH, seguido de los que se encuentran en atención médica y termina con aquellos individuos que acuden de manera constante a la atención (individuos monitoreados). La medición de la CVC mediante los sistemas de salud, subestima la verdadera CVC y es insuficiente para determinar la carga viral poblacional (CVP: concepto que considera no sólo a las personas que se encuentran en la cascada de atención, sino a todas las personas infectadas por VIH, diagnosticadas o no); debido a que se excluyen individuos con infecciones recientes y a aquellos que no han sido diagnosticados (80,81) (Figura 12).

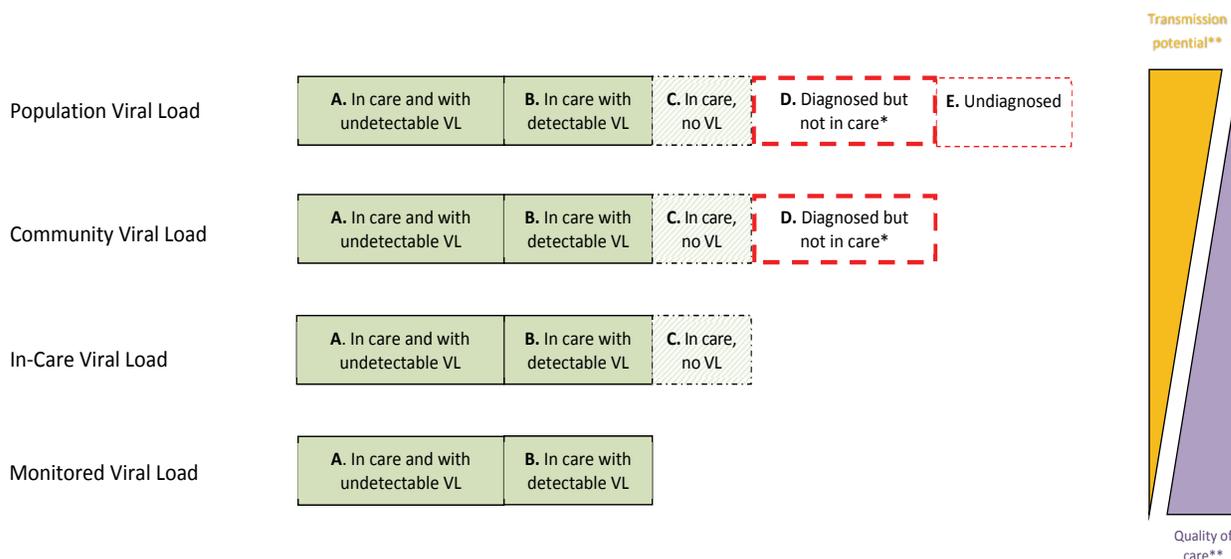


Figura 12. Marco conceptual para las medidas poblacionales de carga viral entre individuos infectados con VIH. La carga viral poblacional (CVP), la carga viral comunitaria (CVC), la carga viral en atención médica y la carga viral monitoreada; se sugieren como medidas poblacionales para la vigilancia de VIH. Se describen las cuatro medidas de acuerdo con sus componentes: A. individuos en atención médica con carga viral (CV) indetectable (en supresión viral), B. Individuos en atención médica con CV detectable, C. individuos en atención médica pero sin determinación de la CV, D. individuos diagnosticados con VIH pero que no están en atención médica, y E. Individuos no diagnosticados. Con base en sus componentes, cada medida tiene una relación establecida entre el potencial de transmisión del VIH y la calidad de la atención médica, la cual se muestra a la derecha (triángulos amarillo y morado) (81).

La complicada utilidad de la CVC como medida de transmisión del VIH en la población, se debe sobre todo a la falta de información sobre la prevalencia de VIH y los comportamientos sexuales individuales. Aunado a esto, debido a que el nivel de análisis es poblacional no es posible asumir de manera individual las asociaciones encontradas. Sin embargo, al tener una base poblacional (por ejemplo una encuesta con representatividad nacional en población general) sería posible determinar la CVC y la CVP; así como tener una aproximación al potencial de transmisión del VIH, abordado desde el enfoque poblacional. Se pretende adoptar estas medidas poblacionales como indicadores de la vigilancia del VIH, para su uso a nivel localidad o nacional, como un parámetro de evaluación de las intervenciones preventivas en la transmisión del VIH (80,81).

3. HIPÓTESIS.

Si existe diferencia entre los factores de riesgo que determinan la dinámica de transmisión del VIH entre HSH que acuden a sitios de encuentro, entonces encontraremos diferencias por región geográfica.

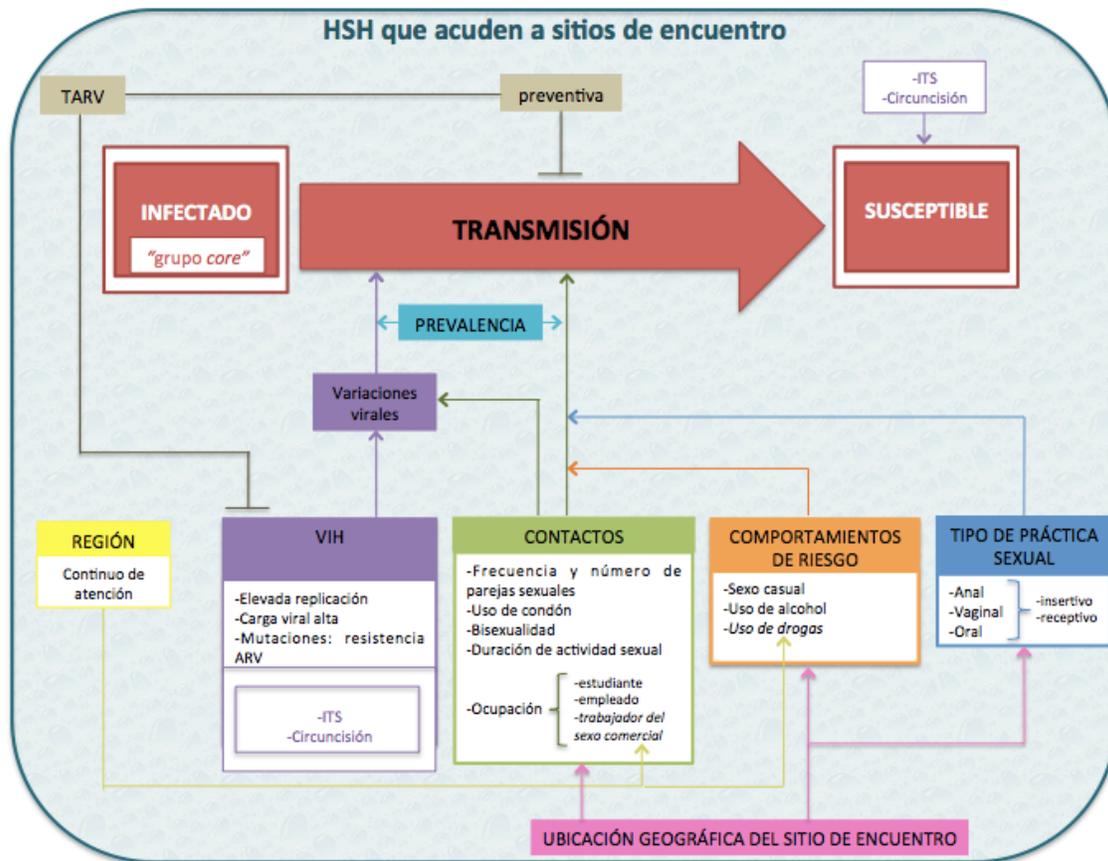
4. JUSTIFICACIÓN

La epidemia de VIH/Sida en México está concentrada en grupos poblacionales con diversos factores de riesgo, tales como las personas privadas de su libertad, los usuarios de drogas inyectables, las y los trabajadores del sexo comercial, y los hombres que tienen sexo con hombres (HSH).

El estudio de los factores de riesgo que se ven involucrados en la dinámica de transmisión de VIH, permitiría encontrar aquellos que tienen un mayor impacto en la transmisión y que por ende podrían ser considerados como un potencial objeto de prevención. Así mismo, entre las diversas combinaciones de estos factores, pudieran encontrarse algunos con mayor impacto en la transmisión y esto podría asociarse al grupo poblacional estudiado o a la región de interés. El análisis de la combinación de factores determinantes de la transmisión de VIH entre HSH, en cada región del país, permitiría generar acciones preventivas específicas para disminuir la transmisión e incluso modificar el enfoque de las ya existentes.

Es relevante **generar información de nuestro país, acerca de los factores determinantes de la dinámica de transmisión del VIH entre HSH que acuden a sitios de encuentro; y evidenciar si estos factores difieren entre regiones.** Esto para apoyar e impulsar el diseño de acciones preventivas en los grupos donde se concentra la epidemia, y para la evaluación de los programas con los que se cuenta actualmente.

5. MAPA CONCEPTUAL.



6. OBJETIVOS.

6.1 Objetivo general.

Identificar los factores de riesgo a nivel individual y poblacional que determinan la dinámica de la transmisión de VIH en cada región del país, con base en una muestra nacional de hombres que tienen sexo con hombres (HSH) que acuden a sitios de encuentro.

6.2 Objetivos específicos.

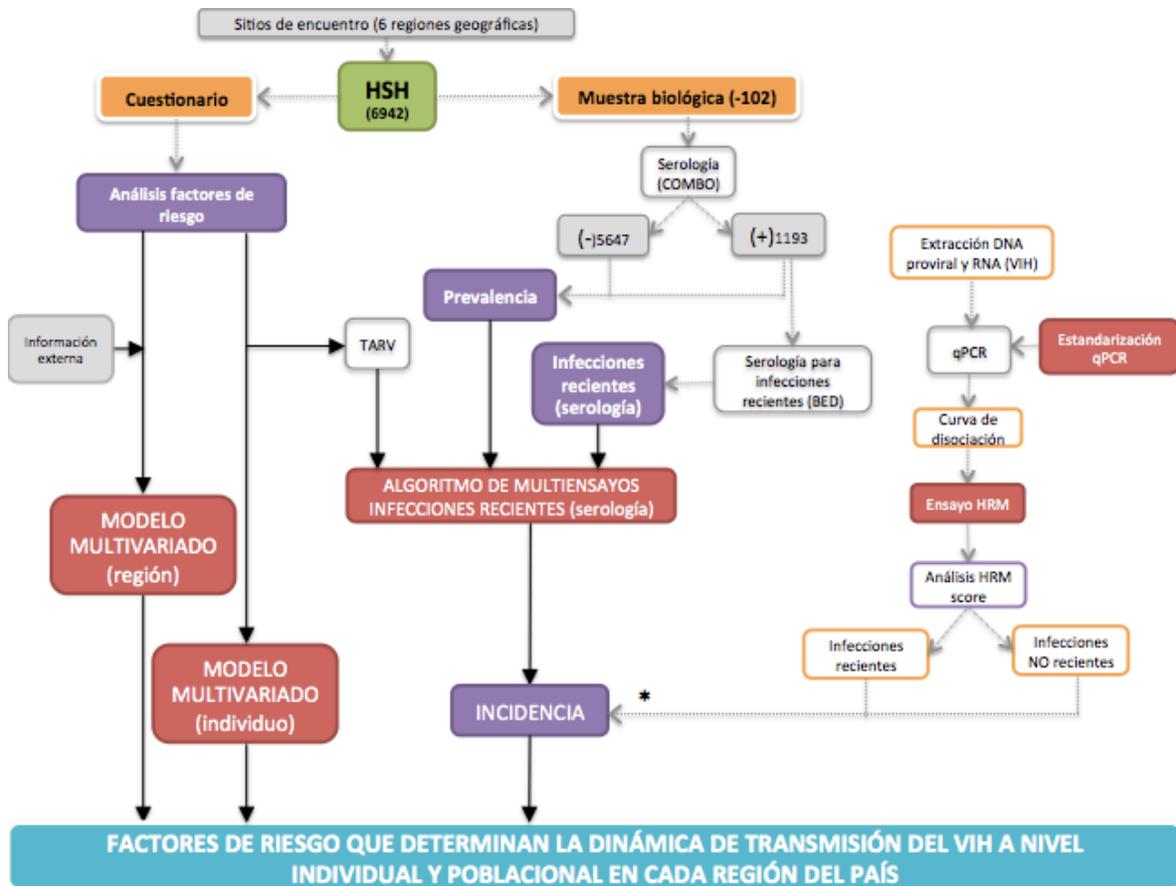
1. Estimar la prevalencia, infecciones recientes e incidencia de VIH entre HSH que acuden a sitios de encuentro.
2. Determinar los factores de riesgo individuales para la prevalencia e infecciones recientes de VIH entre HSH que acuden a sitios de encuentro.
3. Determinar los factores de riesgo regionales para la prevalencia, infecciones recientes e incidencia de VIH en la población de estudio.
4. Desarrollar y proponer una metodología molecular para la diferenciación de infecciones por VIH recientes y no recientes.

6.3 Objetivos metodológicos.

1. Diseñar un algoritmo de pruebas para infecciones recientes por VIH (*RITA*), de acuerdo a información clínica del participante y a resultados de pruebas serológicas.
2. Analizar los factores de riesgo de los participantes de acuerdo a sus cuestionarios e información externa a nivel de ciudad y/o región, e incluir en los modelos posteriores aquellos considerados con potencial para impactar en la transmisión del VIH.
3. Estandarizar un PCR en tiempo real (qPCR) para la amplificación de un fragmento del VIH.
4. Estandarizar la metodología del ensayo *High Resolution Melting (HRM)* y analizar cada una de las muestras para ser clasificadas de acuerdo con su *HRM score*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 Mapa metodológico general.



7.2 Población de estudio.

En México, la epidemia de VIH/Sida se considera como concentrada en grupos específicos tales como los HSH, los trabajadores del sexo comercial y los usuarios de drogas (14,15,85,87). Con el objetivo de reducir la carga de la enfermedad en estas poblaciones, en 2010 el Fondo Mundial para la lucha contra el Sida, la Tuberculosis y la Malaria otorgó a México fondos para el diseño, la implementación y la evaluación de una serie de

estrategias de prevención focalizadas en las poblaciones con más exposición y riesgo de infección por VIH. El programa “Fortalecimiento de las estrategias nacionales de prevención y reducción de daños dirigidas a HSH, HSH-trabajadores del sexo comercial (HSH-TS) y usuarios de drogas inyectables (UDI) de ambos sexos” tiene un alcance nacional y es coordinado por la Fundación Mexicana para la Salud (96).

Como parte de este esfuerzo, el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), a través de su Centro de Investigación en Evaluación y Encuestas (CIEE), fue el responsable de llevar a cabo el proyecto “Diagnóstico situacional, mapeo de sitios de encuentro y evaluación de impacto de las estrategias de prevención de VIH/ Sida en México”. El proyecto se enfocó en evaluar el impacto de dicho programa sobre la prevalencia de VIH/Sida en las poblaciones de alto riesgo de HSH y HSH-TS en México (14,15).

Con el propósito de recopilar información basal epidemiológica y de comportamientos de riesgo de las poblaciones a las que está dirigido el programa, el INSP llevó a cabo en 2011 un mapeo de los sitios de encuentro de HSH y HSH-TS. Este mapeo consistió en un ejercicio de identificación y localización de los sitios de encuentro más concurridos, para obtener información sobre las características de estos sitios y de sus clientes (14,15,97).

Posteriormente se diseñó e implementó una encuesta de línea basal (o inicial), llamada “Encuesta de seroprevalencia de VIH en sitios de encuentro de hombres que tienen sexo con hombres, (versión 2011)” (14,15). Los objetivos de esta encuesta fueron:

- Conocer las características socioeconómicas, las prácticas sexuales, los conocimientos del VIH e ITS, el acceso a servicios de salud y la percepción de estigma y discriminación, en la población HSH que asiste a sitios de encuentro.
- Conocer el porcentaje de HSH con resultados positivos a la prueba de VIH.

El diseño de la encuesta consideró un muestreo por conglomerados (sitios de encuentro) con un tamaño de muestra de 8 586 individuos distribuida en veinticuatro ciudades del país. Cabe destacar que estas 24 ciudades fueron designadas debido a que su prevalencia

de VIH estaba entre las más altas del país (14,15).

En cada ciudad se seleccionó una muestra aleatoria del total de los sitios de encuentro de HSH que se mapearon previamente. La encuesta se aplicó en ciudades representativas de cinco regiones geográficas del país: Noroeste, Noreste, Centro, Centro-Occidente y Sur (15) (Figura 13).



Figura 13. Regiones y ciudades del país donde se realizaron las encuestas (2011: de línea basal y 2013: de seguimiento) (15).

La encuesta incluyó un cuestionario auto-aplicado en computadoras portátiles con audio, y la realización de una prueba rápida de detección de VIH. Todos los procedimientos de la encuesta fueron aprobados por el Comité de Ética del INSP, y fueron explicados en una sesión de capacitación a los entrevistadores, supervisores y coordinadores de campo. Para efectos de esta encuesta y del posterior análisis, se definió como HSH a los individuos que reportaron haber tenido sexo con penetración anal con un hombre en los últimos doce meses (14,15).

El presente trabajo tiene como población de estudio inicial a 6942 HSH que formaron parte de la “Encuesta de seguimiento y evaluación de impacto de las estrategias de prevención, 2013”. Esta encuesta se generó como un seguimiento de la primera versión, 2011 (encuesta inicial); y tuvo como finalidad evaluar el impacto de las intervenciones de prevención implementadas anteriormente. La encuesta de sitios de encuentro 2013

incluye las mismas ciudades mapeadas en 2011, y también fue diseñada e implementada por el CIEE (INSP). Sin embargo, en esta ocasión a cada participante le fue tomada una muestra de sangre seca en papel filtro mediante punción digital para posteriores análisis de laboratorio; a manera de reemplazo de la prueba rápida para VIH (96).

El método de mapeo utilizado en las encuestas es una adaptación del método PLACE. La información es obtenida en el siguiente orden jerárquico: a partir de jefes o dueños de los sitios de encuentro, encargados de los sitios, y finalmente vecinos de estos sitios. Durante el mapeo, al momento de levantar la información se pidieron los datos de cuatro sitios más a donde acuda la población HSH (14,15,97,98).

En el presente trabajo se utilizaron los datos obtenidos del cuestionario de los participantes (base de datos de información sociodemográfica y de comportamiento sexual), así como las muestras de sangre seca en papel filtro (*dried blood spots, DBS*) obtenidas de cada uno de ellos (banco de muestras biológicas).

Al respecto del análisis estadístico (con la correspondiente base de datos), se generó una región geográfica adicional: la CDMX (o también llamada Capital) y área conurbada. Esta última región surgió de la división de la región Centro-Occidente y la misma CDMX. Esta decisión encuentra su fundamento en las diferencias sociodemográficas y de comportamiento sexual de los habitantes de CDMX con respecto de las otras entidades contempladas en el Centro (Puebla, Tlaxcala, Morelos, Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Hidalgo y Estado de México); así como del tamaño de muestra correspondiente en cada región.

El cuestionario aplicado a los participantes contempló ocho bloques: 1) características sociodemográficas e identidad sexual, 2) capital social y uso de servicios de salud, 3) sexualidad, 4) sexo a cambio de regalos o dinero, 5) conocimientos sobre VIH e infecciones de transmisión sexual, 6) estigma y discriminación, 7) preferencias intertemporales y 8) preferencias de riesgo. Para el manejo de la información se conservaron variables del cuestionario por importancia teórica; por ejemplo, la edad y el índice de bienes. El índice

de bienes se construyó con base a 7 bienes: refrigerador, lavadora, calentador de agua, computadora, internet, empleados domésticos y automóviles, recodificándose en bajo (0-2 bienes), medio (3-4 bienes) y alto (5-7 bienes). Otras variables se contemplaron en el análisis debido a su relevancia para el proyecto, como ejemplo el número de parejas sexuales y la consistencia de uso de condón. La consistencia de uso de condón fue construida con base al uso de condón en las tres últimas relaciones sexuales. Algunas variables más se mantuvieron en el análisis por su relación con la cascada de atención al VIH. La variable servicios de salud se refiere a donde acudió el participante a atenderse por alguna enfermedad en el último año. Sexo recompensado se refiere al intercambio de sexo por dinero o regalos alguna vez en la vida. El índice de conocimientos se construyó con base a 6 preguntas sobre conocimientos generales de transmisión de VIH e ITS, recodificándose en bajo (0-1 aciertos), medio (2-4 aciertos) y alto (5-6 aciertos).

Se realizó un análisis descriptivo de las variables analizadas por región geográfica con intervalos de confianza al 95% (IC95%). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa *SPSS Statistics* versión 23.0.0.2 .

7.3 *Sedia*TM BED HIV-1 Incidence EIA (BED): Prueba serológica para detección de infección reciente por VIH.

De acuerdo con la evolución de los biomarcadores de la infección por VIH, aproximadamente a la cuarta semana post-infección comienza la generación de los anticuerpos clase IgG. Esta respuesta inmunológica es la base de múltiples ensayos serológicos que permiten distinguir a las infecciones recientes (menores a 12 meses) (ver figura 7) (33,99).

Algunas características de los ensayos serológicos para infección reciente son su bajo costo, la simplicidad de su procedimiento, y su utilidad-aplicación en estudios de tipo transversal. A nivel internacional el ensayo de diferencia de proporciones *Sedia*TM BED HIV-1 Incidence EIA es una de las pruebas serológicas más utilizada (40,43,100).

El ensayo BED una prueba de segunda generación en ensayos de seroconversión de VIH.

En este ensayo se utilizan antígenos derivados de la región inmunodominante de la proteína gp41, con secuencias de los subtipos más representativos de VIH-1 (o pandémico): B, E y D; es debido a esto que se nombró BED (33,85,101).

El ensayo se fundamenta en la medición de la proporción de anticuerpos IgG dirigidos específicamente para VIH con respecto del total de anticuerpos IgG. De esta medición se obtiene una proporción que debe ser menor en la infección reciente en comparación con la infección prevalente o de larga duración. De acuerdo con las indicaciones del fabricante las muestras se miden por espectrofotometría y aquellas con resultado ≤ 0.8 se consideran de reciente seroconversión. Los resultados obtenidos de este ensayo (número de infecciones recientes) deben utilizarse en conjunto con herramientas y fórmulas matemáticas para llegar a una estimación de la incidencia de VIH (43,44,101,102).

Debido a diferentes variables involucradas con la evolución del virus y con características de la persona infectada, el ensayo BED puede presentar resultados erróneos que llevan a mala clasificación de las muestras (clasificación como infección reciente cuando no lo es). Entre estas variables se pueden mencionar aquellos casos de predominio de algún subtipo de VIH en la población de estudio, aquellas personas infectadas en quienes se controla la replicación del virus de manera espontánea y que mantienen una carga viral indetectable (controles *elite*), el uso de antirretrovirales e inmunosupresión severa (SIDA) (33,43,103).

Los ensayos para infecciones recientes están basados en una respuesta mediada por anticuerpos, de manera que sus resultados pueden verse afectados por la calidad de la muestra analizada y por la respuesta inmunológica propia de la persona infectada. Lo anterior puede tener consecuencias en la clasificación de la infección (como reciente o no reciente), en el diagnóstico y en el seguimiento de la infección. Es por esta razón que el uso de estos ensayos se sugiere únicamente para la estimación de la incidencia poblacional y no para la identificación individual de infecciones recientes (40,48).

En este trabajo, de acuerdo a la logística y disponibilidad del proyecto, se utilizó el estuche *Sedia™ BED HIV-1 Incidence EIA* de la casa comercial *Sedia Biosciences* (de aquí en

adelante BED), como anteriormente se describió y el procesamiento de las muestras se llevo a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ANEXO 1) (104,105).

Con uso de la información clínica y los resultados serológicos de la población analizada a nivel individual, se propuso un algoritmo de pruebas para infecciones recientes que considera las especificaciones de la OMS.

7.4 Análisis estadístico de los resultados

En epidemiología el análisis de los datos obtenidos de una encuesta transversal (como es el caso), depende de los objetivos de la misma y de la escala de medición de las variables de estudio. De manera general, se concibe que las encuestas transversales están dirigidas al estudio de la frecuencia y distribución de eventos de salud y enfermedad (estudios descriptivos), aunque también se utilizan para explorar y generar hipótesis de investigación (estudios analíticos) (106).

El análisis de la información obtenida de este tipo de estudios suele iniciar con la obtención de estadísticas descriptivas de las variables de interés; con la finalidad de conocer las características generales de la población de estudio (Figura 14). El principal estimador obtenido a partir de datos de encuestas transversales es la prevalencia; la cual se refiere al número de casos (del evento de interés) encontrados dividido entre el total de la población en riesgo que se incluyó en el estudio (todo con respecto del periodo de estudio) (106).

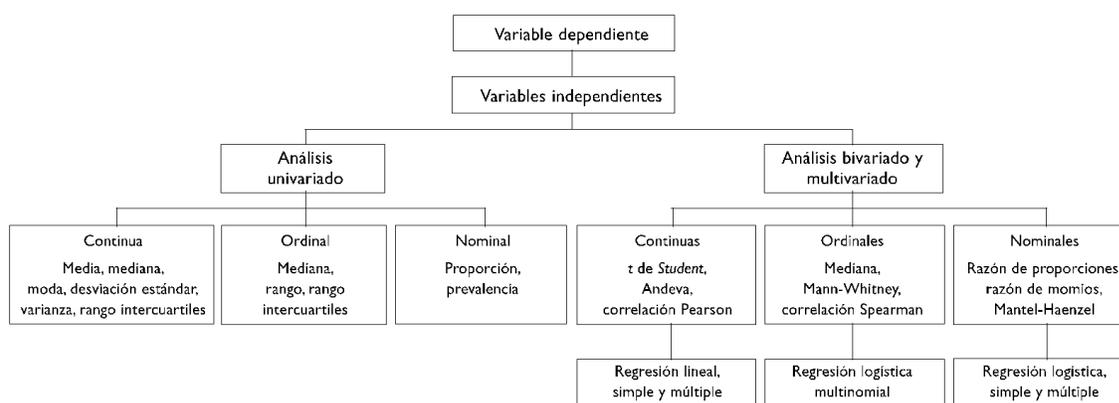


Figura 14. Análisis estadístico por tipo de variable (106).

Con el propósito de ajustar variables confusoras o para evaluar modificación del efecto o interacción, es posible también emplear técnicas de análisis multivariado, ya sea usando regresión lineal múltiple (para variables de exposición categóricas y continuas, y variables de resultado continuas) o regresión logística (para variables de resultado dicotómicas). Es importante mencionar que la construcción de modelos multivariados (la selección de las variables a incluir en el modelo) para el análisis de encuestas transversales se debe guiar por la teoría, por el tipo de muestreo y por el efecto conocido de cada variable en el modelo (106).

El modelo multivariado de regresión logística permite obtener razones de momios crudas y ajustadas por potenciales confusores. Para estos estimadores es posible hacer pruebas de hipótesis para evaluar si son iguales al valor nulo (1) y calcular intervalos de confianza. El valor p convencionalmente aceptado para rechazar una hipótesis nula es $\alpha \leq 0.05$ (106).

El objetivo fundamental de una regresión logística, es predecir cómo influye en la probabilidad de aparición de un evento (dicotómico), la presencia o no de diversos factores (variables) y el valor o nivel de los mismos. La predicción se realiza en función de un conjunto de variables independientes con capacidad explicativa respecto a la variable dependiente (106).

De manera específica, se puede describir a la regresión logística simple como una variación de la regresión lineal para situaciones en que la estimación de la variable dependiente se realiza en términos de probabilidad. En general, la variable dependiente Y puede ser dicotómica o politómica. Las variables explicativas X pueden ser dicotómicas, nominales, ordinales, de intervalo o razón. Los modelos de regresión logística multivariados (o múltiples), son una extensión del modelo simple, esto con el fin de aumentar la capacidad explicativa del modelo ya que incluyen más de dos variables predictoras o explicativas. El objetivo del modelo consiste en determinar la probabilidad

(P) de que ocurra el evento de interés ($Y=1$), dado que se tienen diversas variables explicativas o factores (X_1, X_2, \dots, X_k), por ejemplo de riesgo; incluso en distintos niveles (Ver fórmula) (106).

En este trabajo se desea generar modelos de regresión logística multivariados para predecir la transmisión del VIH, bajo la premisa de que la incidencia es una variable dependiente de la transmisión. Se llevarán a cabo análisis para encontrar las asociaciones de las diversas variables evaluadas con la prevalencia y con la incidencia (estas dos últimas como variables dependientes). Con las variables que resulten asociadas de manera estadísticamente significativas ($p < 0.05$) a la prevalencia y a la incidencia, se realizarán modelos de regresión logística para obtener las variables independientes con mayor valor predictivo del evento de interés. El objetivo es generar estos modelos para cada región geográfica analizada, bajo el supuesto de que los factores que intervendrán en cada uno de estos varían de región en región; esto para ambas variables dependientes: prevalencia e incidencia.

Al igual que el análisis descriptivo de la población, se determinó la prevalencia, incidencia estimada y proporción de infecciones recientes por región geográfica con IC95%. Posteriormente se realizó un análisis de regresión logística bivariado con prevalencia de VIH (prevalentes vs no prevalentes), las variables estadísticamente significativas y aquellas potencialmente confusoras se utilizaron en un análisis multivariado que empleó el método de eliminación progresiva partiendo de un modelo saturado. Adicionalmente se desarrolló otro modelo con la variable de infección reciente de VIH (infección reciente vs VIH negativos; no se consideraron los VIH no recientes), mediante análisis de regresión logística bivariado y multivariado. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa *SPSS Statistics* versión 23.0.0.2 .

La incidencia estimada se calculó mediante la corrección del porcentaje de infecciones recientes con la aplicación de la fórmula propuesta por Hargrove y colaboradores, la cual

toma en cuenta la sensibilidad (S), especificidad (E) y valores predictivos positivo y negativo (VP) de la prueba utilizada; así como la ventana de detección de infección reciente para VIH-1 tipo M subtipo B (ω) y la proporción de falsos recientes (*FRR* o ϵ) (43,107–109).

$$I = \left[\frac{(R) - (\epsilon)(P)}{\left(\frac{R}{2}\right) + \left[N\left(\frac{\omega}{365}\right)\right] - (\epsilon)(N) - \left[\epsilon\left(\frac{P}{2}\right)\right]} \right] \times 100$$

Figura 15. Fórmula de Hargrove y colaboradores para el cálculo de la incidencia estimada a partir de estudios transversales. R: número de infecciones recientes resultantes del ensayo BED, ϵ : FRR: proporción en decimales de falsos recientes, P: número total de personas VIH positivas incluídas en el algoritmo (recientes y no recientes), N: número total de no infectados por VIH evaluados en el estudio, y ω : promedio del tiempo de duración de la infección que puede detectar la prueba BED (en años).

En concordancia con lo detallado sobre la cascada de atención al VIH, se llevo a cabo un análisis de las variables a nivel regional con los datos de la encuesta de seroprevalencia 2013. Se calcularon las estimaciones de prevalencia, infecciones recientes e incidencia para cada región, este análisis pretende describir las diferentes variables a nivel regional o ecológico, que expliquen los diferentes escenarios de transmisión de VIH para cada región del país; al tener en consideración las estimaciones epidemiológicas antes mencionadas.

Los datos de cada participante se agruparon en las 6 regiones geográficas consideradas: CDMX, Sur, Centro, Noroeste, Noreste y Occidente, de acuerdo a su lugar de procedencia. Con la adición de información externa se calculó la mortalidad por VIH, ponderada para cada región; es decir al tomar en cuenta el peso de cada ciudad encuestada dentro de la región (110).

Se generaron variables regionales con las respuestas de cada participante de la encuesta, tales como el diagnóstico, la cobertura de tratamiento antiretroviral y la carga viral; con el propósito de representar aquellos pasos incluidos en la cascada de atención. En caso de

requerirse, se incluirán datos de fuentes externas; por ejemplo del sistema SALVAR y artículos publicados (110,111).

7.5 PCR en tiempo real (qPCR).

La PCR en tiempo real es una técnica basada en la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y se usa para detectar y al mismo tiempo cuantificar moléculas de DNA o DNA complementario; de manera que, se permite la obtención de datos fiables y precisos sobre la expresión o la cantidad del gen en cuestión (112). Al igual que el PCR punto final, también incluye las etapas de desnaturalización, alineamiento y extensión. Sin embargo, en el qPCR se adiciona una etapa final e independiente llamada etapa de disociación (la cual se definirá más adelante) (112). El tamaño óptimo de los amplicones generados mediante el qPCR oscila entre las 60 y 150pb, con posibilidad de extensión a no más de 200pb. En contraste con el PCR punto final, el qPCR es un método más sensible que además arroja resultados cuantitativos. Durante la corrida de qPCR, los productos de amplificación se observan a medida que transcurre cada uno de los ciclos (113).

El qPCR se fundamenta en:

- La detección y cuantificación de un reportero fluorescente, cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en la reacción.
- El empleo de un termociclador que tiene acoplado un sistema de detección, que es capaz de adquirir y cuantificar la señal emitida por el reportero al final de cada ciclo para cada muestra.

La química de la detección está dada por: i) Agentes intercalantes fluorescentes (por ejemplo *SYBR Green*), ii) Sondas de hidrólisis (*TaqMan*), iii) Sondas de *loop* (*Molecular Beacons*, *Scorpions*) y iv) Sondas de hibridización (112,113).

En este proyecto se utilizó un agente intercalante. Los agentes intercalantes se unen al DNA bicatenario dando un incremento de la fluorescencia a medida que aumenta la cantidad de producto de PCR. Es simple, económico, fácil de usar, sensible, versátil y no se

necesitan sondas específicas. Sin embargo, durante la reacción de PCR el agente intercalante puede unirse a dímeros de oligonucleótidos y a otros productos inespecíficos (112). Las reacciones son caracterizadas en el momento en el que la amplificación de un producto de PCR se detecta, después de un número fijo de ciclos. Cuanto más alto es el número de copias del DNA blanco, más pronto se observa el aumento significativo en la fluorescencia. Con el software adecuado, una corrida de qPCR muestra un diagrama de amplificación donde los cambios de fluorescencia se grafican respecto al número de ciclos (Figura 16). En los ciclos iniciales de PCR, hay un pequeño cambio en la señal de fluorescencia; esto define la línea de fondo para el diagrama de amplificación. Un aumento en fluorescencia sobre la línea de fondo indica la detección del producto acumulado de PCR (112,113).

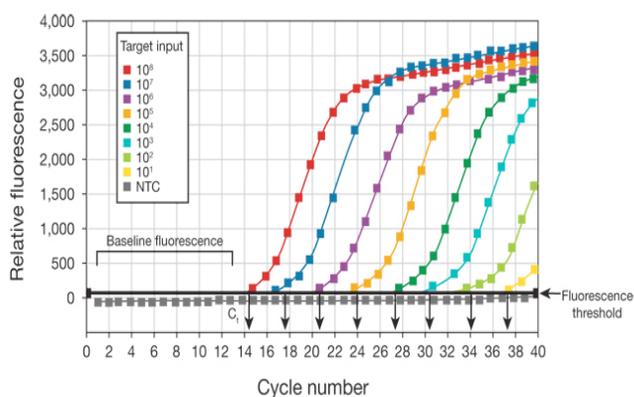
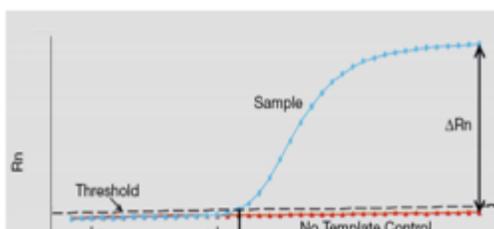


Figura 16. Gráfica de amplificación. Estos diagramas son creadas cuando la señal de fluorescencia de cada muestra es graficada contra el número de ciclo. Por lo tanto, esta gráfica representa la acumulación de producto durante la reacción de PCR tiempo real (112).

Los datos se adquieren en cada ciclo del PCR. El número de ciclo al cual la intensidad de emisión del fluoróforo aumenta con respecto al ruido de fondo (*background*) se conoce como ciclo umbral (C_t : *threshold cycle* o C_q : *quantification cycle*). El C_t está determinado en la fase exponencial de la reacción y es más confiable que las mediciones en el punto



final convencional. El C_t es inversamente proporcional al número de copias del DNA blanco: a mayor concentración de blanco, menor C_t medido (112,113) (Figura 17).

Figura 17. Ciclo umbral (*threshold cycle/C_t*) (113).

La gráfica del logaritmo del número inicial de copias del blanco para un sistema de estándares contra C_t es una línea recta. La cuantificación de la cantidad de blanco en muestras desconocidas es lograda midiendo el C_t , y usando la curva estándar para determinar el inicio del número de copias. Así mismo, las curvas estándar al ser generadas con diluciones seriadas de una concentración conocida de DNA base, son útiles para calcular la eficiencia de la reacción (Figura 18). Al igual que en el PCR punto final, en las corridas de qPCR deben añadirse controles negativos (H_2O -*No template control NTC*- o DNA de cualquier otro organismo) y controles positivos en diferentes diluciones. Para obtener resultados más certeros, cada muestra se procesa por triplicado (112,113).

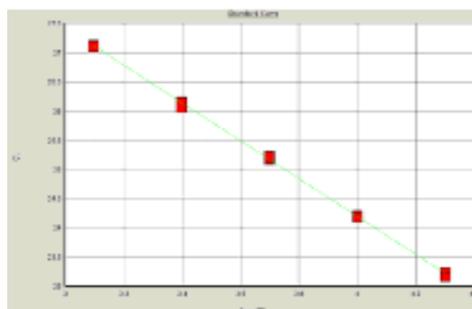


Figura 18. Curva estándar (112).

A manera de sustitución de la electroforesis en gel, en el qPCR se adiciona la etapa de disociación (de manera independiente y posterior de la reacción de PCR); durante la cual

se realiza un cambio lento de temperatura en la placa (temperatura en decremento) y se continúa midiendo la fluorescencia. La fluorescencia detectada para cada muestra vs la temperatura, son graficadas al final de la reacción de PCR y dan origen a la curva de disociación. De acuerdo al tamaño y composición del amplicón en cuestión, la T_m (temperatura de fusión) de este se debe mantener constante y al realizar la primera derivada negativa, el dato de una única T_m debe representarse solo por un pico en el gráfico (114) (Figura 19).

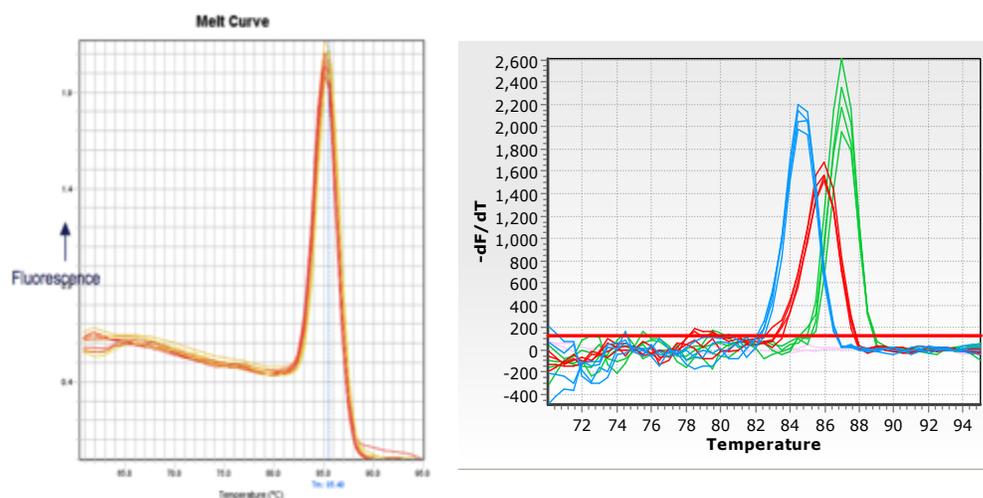


Figura 19. Curvas de disociación. Izquierda, la gráfica representa un único producto de la amplificación, un solo pico. Derecha, representa 3 distintos productos de amplificación en la misma gráfica. Estos productos se distinguen por sus correspondientes T_m y pico de fluorescencia (114).

Algunos de los términos más utilizados en el qPCR, se describen en la siguiente lista (112–114):

- Línea base (*Baseline*): nivel de señal durante los ciclos iniciales del PCR, se conoce como el fondo o ruido de la reacción.
- Umbral (*Threshold*): nivel de señal que refleja un incremento estadísticamente significativo sobre la señal de la línea base. Generalmente, los equipos de PCR ajustan este umbral a 10 veces la desviación estándar del valor de la línea base.
- Ciclo umbral o ciclo de cuantificación (C_t : *threshold cycle* o C_q : *quantification cycle*): es el número de ciclo al cual la señal de fluorescencia de la reacción cruza el

umbral. Este número es usado para calcular el número inicial de copias de DNA, debido a que el valor de C_t es inversamente proporcional a la cantidad inicial de DNA blanco.

- Curva estándar (*Standard curve*): se realiza con una serie de diluciones de concentraciones de templado conocidas, para determinar la cantidad inicial de DNA blanco. Se gráfica con el logaritmo de cada concentración conocida en las diluciones (eje x) contra el valor de C_t para cada concentración (eje y). Como resultado de esta curva, se obtiene la ecuación de la misma, lo que es útil al momento de establecer los valores de [DNA] para las muestras problema.
- Coeficiente de correlación (R^2): es una medida de que tan bien se ajustan los datos reales a una curva estándar. Este valor refleja la linearidad de la curva e idealmente se prefieren valores muy cercanos a 1.
- Intersección con el eje Y (*Y-intercept*): corresponde al límite teórico de la detección de la reacción, o el valor de C_t resultante si el número de copias más bajo de moléculas de DNA blanco indicados en el eje x dio lugar a una amplificación estadísticamente significativa.
- Fase exponencial: fase del PCR durante la cual se cuantifican los datos para el qPCR, debido a que durante esta todos los reactivos se encuentran en exceso, la enzima es altamente eficiente y la amplificación del producto (que está en baja cantidad), no se ve afectada por dimerización de oligonucleótidos.
- Pendiente (*slope/m*): la pendiente de la fase exponencial del PCR que en una gráfica semilogarítmica aparece como lineal y es la medida de la eficiencia de reacción. Para obtener resultados reproducibles, la eficiencia se debe acercar lo más posible al 100%, lo que equivale a una pendiente de -3.32.
- Eficiencia: se calcula mediante la fórmula $E = [10^{(-1/m)} - 1] \times 100$. La eficiencia ideal debe ser del 100%, lo que significa que el DNA molde se duplica después de cada ciclo térmico durante la fase exponencial.
- Rango dinámico: intervalo en el cual un incremento en la cantidad inicial de DNA blanco, resulta en un correspondiente incremento en la amplificación del

producto. Idealmente, el rango debe ser de 7 a 8 órdenes de magnitud para plásmidos y al menos 3 a 4 órdenes para DNA genómico.

- Cuantificación absoluta: describe un experimento de qPCR en el cual las muestras de concentración conocida son diluídas de forma seriada y amplificadas para generar una curva estándar. Las muestras problema son cuantificadas por su interpolación en esta curva.
- Cuantificación relativa: describe un experimento de qPCR en el cual la expresión de un gen de interés en una muestra (por ejemplo, tratada) es comparado con la expresión del mismo gen en otra muestra (por ejemplo, no tratada). Los resultados se expresan como el cambio en número de veces que expresó uno con respecto del otro.
- Curva de disociación (*Melt curve*): una curva de disociación muestra el pico correspondiente al cambio en la fluorescencia observada cuando el DNA de doble cadena se encuentra con fluoróforos incorporados (elevación), y cuando se disocia o se funde en DNA de cadena sencilla (declive) por efecto de la temperatura (derivada del cambio en la fluorescencia contra cambio en la temperatura). Para agentes intercalantes el punto más elevado de la curva se denomina T_m (temperatura de fusión correspondiente al punto de fusión). Esto sucede con cada producto de la amplificación, de tal manera que cada pico en la gráfica corresponde a un distinto amplicón (114).

En este trabajo se estandarizó un qPCR para amplificar un fragmento del genoma del VIH. Los fragmentos propuestos para la amplificación, surgieron de las secuencias nucleotídicas de los tres genes estructurales del VIH: *gag*, *pol* y *env*. Estos fragmentos ya han sido utilizados en estudios anteriores bajo la metodología *High Resolution Melting*. Los resultados de estos estudios, las secuencias de los fragmentos y los oligonucleótidos utilizados se encuentran publicados en artículos de libre acceso (5,6,46,47,115,116). A continuación se presenta una tabla donde se resaltan los fragmentos antes mencionados

(Tabla 6).

Region analyzed*	Corresponding region in HXB2*	Sequences of primers used to produce amplicons for HRM diversity analysis ¹	Amplicon size (bp)
GAG1 (p7)	1998–2097	Forward: 5'–AAATTGCAGGGCCCTAGGAA–3' Reverse: 5'–TTTCCCTAAAAAATTAGCCTGTCT–3'	100
GAG2 (p6/TF)	2068–2278	Forward: 5'–ACTGAGAGACAGGCTAATTTTGTAG–3' Reverse: 5'–GGTCGTTGCCAAAGAGTGATTTG–3'	211
GAG3 (p24)	1471–1761	Forward: 5'–ATGAGAGAACCAAGGGGAGTGA–3' Reverse: 5'–TTGGACCAACAAGGTTTCTGTCATCCA–3'	291
POL (PR/RT)	2373–2597	Forward: 5'–AAATGGAAACCAAAAATGATAG–3' Reverse: 5'–CATTCCTGGCTTTAATTTTACTG–3'	225
POL2 (integrase)	4535–4695	Forward: 5'–AAAATTAGCAGGAAGATGGCCAG–3' Reverse: 5'–TATTCATAGATTCTACTACTCCTTG–3'	161
POL3 (integrase)	4784–4922	Forward: 5'–TAAAAGAAAAGGGGGATTGG–3' Reverse: 5'–TCTGCTGTCCCTGTAATAAACCC–3'	139
ENV1 (gp41 HR1)	7798–8036	Forward: 5'–CAGCAGGWAGCACKATGGG–3' Reverse: 5'–GCARATGWGYTTTCCAGAGCADCC–3'	239
ENV2 (gp41 IDR)	7950–8119	Forward: 5'–CTYCAGRCAAGARTCYTGGC–3' Reverse: 5'–TCCCAYTSCAKCCARGTC–3'	170
ENV3 (gp41 HR2)	8016–8299	Forward: 5'–TGCTCTGGAARWCATYTGC–3' Reverse: 5'–AARCCCTCTACTATCATTATRA–3'	284
ENV4 (gp120 V4)	7358–7540	Forward: 5'–TRGAGGRGAATTYTCTAYTG–3' Reverse: 5'–ATRGGAGGGGCATAYATTGC–3'	183
ENV5 (gp120 V5)	7521–7654	Forward: 5'–GCAATRTATGCCCTCC–3' Reverse: 5'–TCYYTCATATYTCCTC–3'	134
NEF1 (nef)	8749–9038	Forward: 5'–ACATACCTAGAAGAATAAGACAGGG–3' Reverse: 5'–TAAGTCATTGGTCTTAAAGGTACCTG–3'	290

Tabla 6. Regiones analizadas del genoma de VIH mediante el uso del ensayo *High Resolution Melting*. De los fragmentos mostrados en la tabla, un primer criterio de selección fue elegir al menos uno de cada gen. LA primer columna muestra el gen de VIH analizado, la segunda la posición del fragmento en el genoma de VIH (genoma de referencia HXB2), luego se muestra el par de oligonucleótidos para cada fragmento y finalmente el tamaño del amplicón en pares de bases. En los recuadros azules se destacan los fragmentos elegidos de acuerdo al diseño óptimo de sus oligonucleótidos (GAG2, POL3 y ENV1). En rojo se muestran los que requirieron el diseño de oligonucleótidos internos para un tamaño ideal como amplicón de qPCR (60-150pb) (115).

Como se ha mencionado en la tabla 9, los oligonucleótidos de los fragmentos elegidos se analizaron con el uso del programa OligoAnalyzer 3.1 de IDT Tools, disponible de manera gratuita en www.idtdna.com; con el objetivo de lograr una amplificación más certera y correcta del producto de interés. El análisis de los oligonucleótidos se centró en buscar que estos cumplieran con las características de diseño óptimo tales como el tamaño (no más de 24pb), el porcentaje de GC (50-60%), Tm no mayor de 5°C entre cada uno, y en cuanto a la formación de horquillas (*hairpins*), homodímeros y heterodímeros (con su correspondiente forward o reverse); se prefirió que estas interacciones fueran de baja

importancia \geq -5Kcal/mol. De manera conjunta, se realizó un alineamiento del amplicón generado en la base de datos del NCBI mediante la herramienta BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Una vez seleccionado el fragmento de VIH para amplificar por qPCR, con los resultados de la etapa de disociación se llevó a cabo el análisis de la curva de disociación mediante el ensayo *High Resolution Melting (HRM)*.

7.6 Ensayo High Resolution Melting (HRM).

La tecnología *HRM* es la base para el desarrollo de un ensayo que busca determinar la diversidad de múltiples microorganismos. Así mismo, estos ensayos se han asociado con la detección de mutaciones en enfermedades genéticas y Cáncer. Uno de los microorganismos en los cuales se ha usado más el *HRM*, es el VIH (5,115).

Las aplicaciones del *HRM* en VIH han sido variadas, y entre estas se cuentan aquellas que relacionan cuasiespecies virales de VIH entre madre e hijo, entre individuos relacionados por prácticas sexuales; y para la estimación y clasificación de infecciones por VIH en recientes y no recientes (5,6,45–47,115–119).

La diversidad del VIH típicamente se incrementa a lo largo del tiempo durante el curso de la infección. La replicación viral rápida, las mutaciones frecuentes y los eventos de recombinación generan un gran número de variantes virales. Así mismo, la respuesta inmune ante la infección, el uso de TARV, y otras presiones selectivas manejan la diversificación y evolución de la población viral intra-individuo (58,60).

De acuerdo con lo mencionado, debido a la diversificación del VIH a lo largo del tiempo, la diversidad genética puede servir como un biomarcador para la evaluación de la incidencia de VIH (al definir teóricamente infecciones recientes). Sin embargo, los patrones de diversidad del VIH pueden variar de una región genómica a otra. Por lo tanto, es recomendable para la discriminación entre infecciones recientes y no recientes llevar a cabo un análisis de la diversidad en más de una región del genoma del VIH (6,46,47,116).

La finalidad del ensayo *HRM* aplicado a la discriminación entre infecciones recientes y no recientes por VIH, consiste en medir la amplitud (anchura de la base) de la curva de disociación correspondiente a una muestra amplificada por qPCR; y su posterior comparación con respecto de un conjunto de muestras de temporalidad conocida. El fundamento de la diferenciación entre infecciones recientes y no recientes se encuentra en que a medida de que aumenta el tiempo de infección en el individuo, la diversidad genética de su virus se aumenta también, y por ende el ancho de la base de la curva de disociación (6,46,47,116).

El fenómeno mediante el cual se construye la curva de disociación de la muestra, y en el cual se basa el análisis del *HRM*, se conoce como disociación (fusión) del amplicón. En los ensayos de *HRM*, se observa la fusión del DNA mientras la muestra se calienta en un intervalo de temperaturas. La disociación del DNA bicatenario es visualizada como la disminución de la fluorescencia debido a la liberación de un agente intercalante fluorescente que saturaba el material genético (5,6,114–116).

Como resultado del ensayo *HRM*, se genera un único dato numérico para cada muestra conocido como *HRM score*. Este score refleja el nivel de diversidad del VIH en la región analizada. El cálculo del score es sencillo e incluso se puede realizar de manera automática, a partir de los datos de la curva de disociación. (Figura 20). En estudios donde se utiliza el ensayo *HRM*, se ha encontrado que los *HRM scores* están asociados con las etapas de la infección por VIH en adultos; lo cual sugiere que este ensayo puede ser útil para estimar la incidencia de VIH a partir de estudios transversales (6,46,115,117).

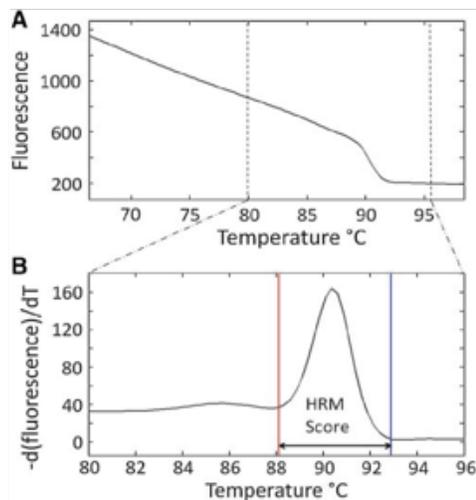


Figura 20. Datos representativos del ensayo *HRM*. (A) Datos de *HRM* de una muestra clínica representativa (gráfica de fluorescencia vs temperatura). (B) Curva de disociación para la muestra del panel A (gráfica de la primera derivada negativa fluorescencia vs temperatura, $(-d[\text{fluorescencia}]/dT)$). Los márgenes de la curva de disociación (en las líneas roja y azul), definen el *HRM score* (medida de la amplitud de la curva de disociación). Estos márgenes se establecen de acuerdo al análisis de los datos, justamente en donde la curva alcanza un ángulo de 30° en comparación con la línea horizontal base (45).

De manera general, el ensayo *HRM* se inicia con la extracción del material genético de interés a partir de las muestras biológicas. Las muestras biológicas más utilizadas, en el caso del VIH, son el suero y el plasma. Posteriormente el RNA o DNA extraído es purificado, y mediante qPCR con el uso de un agente intercalante se amplifica la región genómica de elección. En caso de que el material genético extraído haya sido RNA, es necesario realizar un RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa) para generar DNA o directamente un PCR tiempo real con reversotranscripción (RT-qPCR). En estudios previos donde usan *HRM* para analizar la diversidad genética del VIH, los fragmentos genómicos más utilizados pertenecen a sus genes estructurales: *gag*, *pol* y *env* (5,45,116).

Al término de la amplificación, se lleva a cabo la etapa de disociación. Durante esta etapa el DNA es disociado mientras se aumenta la temperatura, y el agente intercalante es liberado. Al final de esta etapa se construye la curva de disociación, con los datos

recogidos de fluorescencia vs temperatura (5,6,114,116).

La adición del ensayo *HRM*, implica que al término de la etapa de disociación (una vez generada la curva), los datos de fluorescencia y temperatura son analizados con la librería DivMelt: *HRM diversity assay analysis tool* (<http://cran.r-project.org/web/packages/DivMelt/index.html>) en el software R; con el objetivo de establecer los márgenes de cada curva de disociación. El margen de inicio de la curva de disociación se conoce como Theta 1 (T1) y el margen final como (Theta 2) T2. Cada uno de estos márgenes esta asociado con una temperatura específica, y la diferencia entre estas (T2-T1) origina el *HRM score* (116) (Figuras 21 y 22).

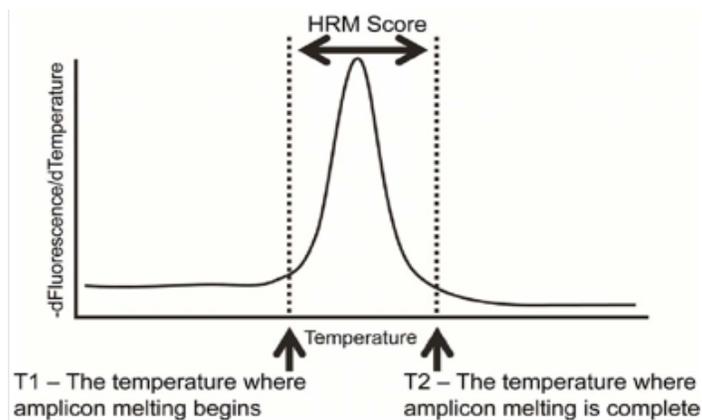


Figura 21. Curva de disociación y sus márgenes. Con los datos de temperatura obtenidos de la curva de disociación, el cálculo del *HRM score* se realiza restando T2 menos T1 (116).

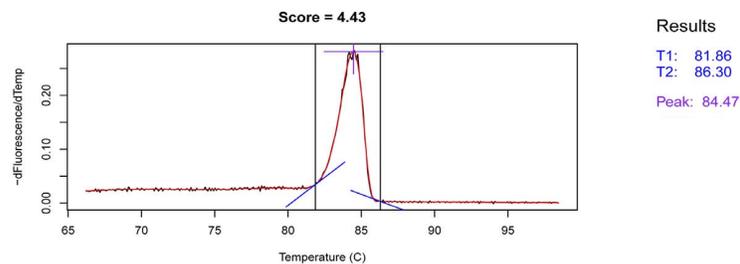


Figura 22. Ejemplo gráfico de un *HRM score*. En la gráfica se observa la curva de disociación de una muestra representativa, cuyo pico máximo correspondiente a un solo amplicón se encuentra en 84.47 °C. Así mismo, se ubican los márgenes inicial y final de la curva (líneas azules) y sus correspondientes temperaturas: 81.86 y 86.30 °C, respectivamente. El *HRM score* correspondiente a esta muestra (4.43) se obtiene del cálculo de la diferencia de T2

(86.30 °C) y T1 (81.86 °C) (116).

La determinación de T1 y T2, se realiza mediante el trazado de diversas líneas tangentes en los límites de la curva de disociación. En el límite de la curva de disociación se establece una ventana de amplitud, la cual contiene a los puntos exactos donde la curva inicia y termina. En esta ventana es en donde se trazan las líneas tangentes. Para cada línea se calcula el correspondiente ángulo respecto de la línea basal horizontal. La línea elegida inicialmente (recomendada por los desarrolladores del software) será aquella que posea un ángulo de entre 30° y 50°. Cuando se requiera un ajuste en el ángulo se probarán configuraciones diversas para este propósito. Entonces, justo donde esta línea toca a la curva de disociación se establecen T1 o T2 según sea el caso (5,45,116) (Figura 23).

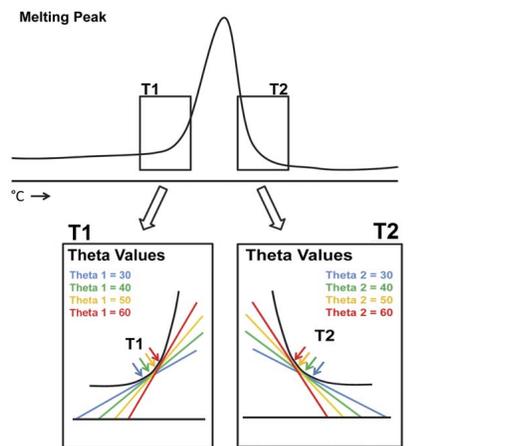


Figura 23. Selección de los valores de T1 y T2. En colores se muestran las líneas tangentes a la curva y los puntos exactos donde se unen a la misma. Así mismo, se observan los valores del ángulo que forman con la línea basal horizontal. Los valores óptimos de T1 y T2 son aquellos marcados en líneas azules (ángulo 30°) (modificada) (116).

En el presente trabajo, se utilizó el ensayo *HRM* para diferenciar las infecciones recientes de las que no lo son; a través del análisis de las curvas de disociación generadas al amplificar los fragmentos genómicos elegidos del VIH mediante qPCR y RT-qPCR con agente intercalante (*SYBR Green*).

En un primer análisis se estableció el punto de corte en los *HRM scores* para definir si la

muestra corresponde a una infección reciente o a una no reciente. Esto con base en los *HRM scores* hallados para infecciones verdaderamente recientes (muestras de paneles confirmados de incidencia real) y no recientes (muestras de paneles confirmados de prevalencia). Estos paneles de muestras provienen de HSH que viven con VIH y que acuden a la Clínica Especializada Condesa, la composición de estos se detallará más adelante. Las muestras de estatus desconocido con *HRM scores* menores al punto de corte se clasificarán como infecciones recientes, y aquellas con *HRM scores* por encima del mismo serán clasificadas como no recientes.

8. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD.

Las muestras y los datos que se utilizaron en el presente estudio fueron obtenidos de la segunda “Encuesta de seroprevalencia de VIH en sitios de encuentro de hombres que tienen sexo con hombres (versión 2013); la cual fue diseñada y realizada por el Centro de Investigación en Evaluación y Encuestas (CIEE) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). Como parte fundamental de esta encuesta se obtuvo el consentimiento informado de cada uno de los participantes.

Con aprobación del grupo investigador responsable de las muestras e información de la encuesta, en el presente trabajo se determinaron las infecciones recientes por VIH; así como la diversidad genética de estas muestras. Para fines de este trabajo, también se analizó la información proporcionada de manera anonima por cada participante. Se anexa la carta de autorización de uso por el responsable del estudio, ANEXO 2. Así también, se anexa la carta de acreditación del curso de bioética del CITI Program correspondiente al responsable del presente trabajo (ANEXO 3).

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron muestras biológicas de tipo sangre seca en papel filtro (*DBS*). La manipulación de la muestras se realizó bajo las normas de bioseguridad adecuadas, con el uso de equipo de protección personal completo en un laboratorio nivel 2 de bioseguridad (Se anexa acreditación del curso de bioseguridad perteneciente al CITI program, ANEXOS 4 y 5). De acuerdo con el procedimiento de

manejo de los residuos peligrosos biológico-infecciosos (R.P.B.I.), el material de desecho se dispuso en bolsas o contenedores rojos debidamente etiquetados y pesados para su posterior manejo por una empresa externa al INSP; la cual recolecta el residuo de manera semanal (todos los martes de 9-10hrs).

Así mismo, algunos procedimientos que formaron parte del estudio contemplan el uso de materiales peligrosos tipo C.R.E.T.I., principalmente bromuro de etidio, y algunos solventes como Fenol, Cloroformo y Alcohol Isoamílico. El desecho de estos materiales se dispuso en frascos de plástico debidamente etiquetados y pesados. Estos residuos se pusieron a disposición del responsable de bioseguridad en el Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas (C.I.S.E.I.) en los períodos de recolección indicados para su manejo final (aproximadamente cada 6 meses).

9. RESULTADOS.

9.1. Estimación de la prevalencia, infecciones recientes e incidencia de VIH entre HSH que acuden a sitios de encuentro.

9.1.1 Prevalencia de VIH en la población de estudio.

A partir de los *DBS* de cada participante y de manera previa al presente estudio se realizó un inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas para determinar infecciones por VIH mediante la detección simultánea de antígenos y anticuerpos (*HIV Ag/Ab Combo, Architect, Abbott Diagnostics Division™*, sensibilidad 100% y especificidad $\geq 99.68\%$); el cual se utilizó de acuerdo a lo establecido por el fabricante (ANEXO 6) (120,121).

De los 6942 participantes de la encuesta, se excluyeron 102 por carencia de muestra biológica. Se procesaron 6840 muestras para la detección de VIH, de las cuales 1193 resultaron positivas. De acuerdo con la fórmula siguiente se calculó la prevalencia total (P), quedando como sigue:

$$P = \left[\frac{(1193)}{(6840)} \right] \times 100 = 17.44\%$$

Así mismo, se calculó la prevalencia para cada región con la misma metodología (tabla 21).

9.1.2 Porcentaje de infecciones recientes e incidencia de VIH (algoritmo *RITA*).

Anteriormente al presente trabajo, las muestras de *DBS* de cada participante de la encuesta de seroprevalencia de VIH 2013 fueron procesadas para determinar cuales de ellas eran infecciones recientes por VIH. El ensayo utilizado fue el de diferencia de proporciones BED, y el procesamiento se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Ver ANEXO 1). El total de muestras incluidas en este estudio (n= 6840) fueron procesadas con este ensayo y resultaron 472 (6.9%) clasificadas como infecciones recientes con base únicamente en el resultado obtenido con el estuche comercial y de acuerdo a los puntos de corte que el mismo establece (104,105,109,122). Cabe mencionar, que el número de infecciones recientes determinadas sólo con el ensayo BED se ve modificado más adelante al constituir el algoritmo siguiente con mayor información.

9.1.3 Algoritmo de pruebas para infecciones recientes por VIH (*RITA*).

El *RITA* generado para el presente estudio, inicio con los 6840 participantes con muestra biológica disponible. Este continuó con todos aquellos participantes con un resultado positivo a VIH mediante la prueba combo (n= 1193). Se decidió utilizar como variable de importancia clínica al reporte de TARV. De los participantes positivos a VIH, se mantuvieron aquellos que reportaron en su cuestionario no haber iniciado la terapia antiretroviral (n= 848). Para el caso del uso de TARV se decidió conservar solo a los participantes que reportaron no estar bajo terapia, debido a que de acuerdo con las especificaciones del estuche comercial BED y al fundamento de este para la determinación de una infección reciente, las personas en TARV pueden presentar resultados erróneos y mal clasificarse como recientes cuando no lo son. Como último paso en el algoritmo, se clasificó como infecciones recientes a aquellos participantes que en la prueba BED resultaron con un índice menor a 0.8, de acuerdo a lo especificado por el fabricante (n=

242) (Ver ANEXO 1).

Con el propósito de mejorar el *RITA* propuesto, se llevó a cabo la estandarización de un ensayo molecular para discriminar infecciones recientes llamado *High Resolution Melting (HRM)*. Este ensayo será descrito posteriormente.

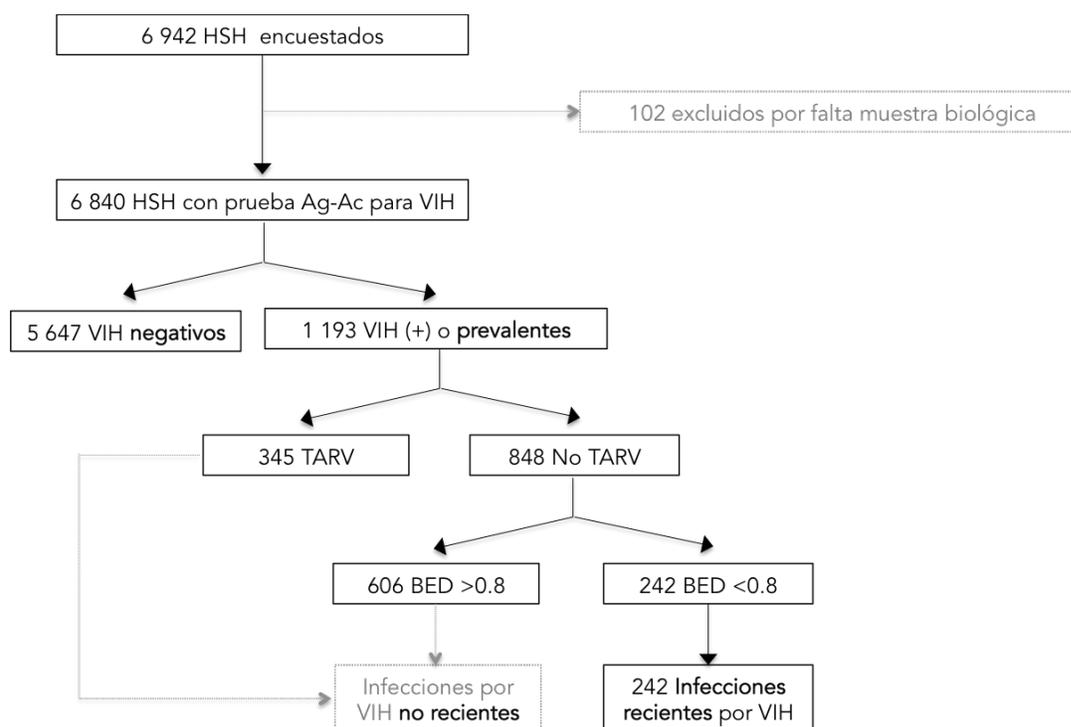


Figura 24. Algoritmo de pruebas para infecciones recientes por VIH o *RITA* generado para el estudio (serología).

Con el número de participantes positivos a VIH (casos prevalentes), los negativos y los casos de infecciones recientes, se llevó a cabo el cálculo de la incidencia estimada con la fórmula de Hargrove y colaboradores descrita en la metodología.

Se consideraron los siguientes datos:

- El número de infecciones recientes obtenido con el *RITA* (incluye exclusivamente resultados de serología).
- La ventana de detección (ω) de 153 días, de acuerdo a lo recomendado por la OMS

para el uso del ensayo BED en países como México, con predominio de infecciones por VIH-1 tipo B (mayores del 95%) (43).

- La proporción de falsos recientes (*FRR*) o (ϵ), que se calculó con un estudio previo de 224 HSH asistentes a la Clínica Especializada Condesa, en el cual se determinaron los parámetros de la prueba BED con muestras de *DBS*. Se obtuvo un *FRR* de 10.71% (123). Este dato coincide con el utilizado por otros estudios en países americanos con prevalencias de VIH-1 B superiores al 95% como Honduras, El Salvador y Estados Unidos, en sus ajustes a la incidencia (43).

Incidencia estimada:

$$I = \left[\frac{(242) - (0.1071)(1193)}{\left(\frac{242}{2}\right) + \left[5647\left(\frac{153}{365}\right)\right] - (0.1071)(5647) - \left[0.1071\left(\frac{1193}{2}\right)\right]} \right] \times 100 = 6.3 \text{ apo}$$

Así mismo, los resultados obtenidos con la fórmula anterior fueron corroborados con la hoja de cálculo *SACEMA's online resource for incidence estimation*, publicada por la OMS para la estimación de la incidencia a partir de datos transversales, la cual considera los parámetros ya descritos. Esta hoja se encuentra disponible en <http://www.incidence-estimation.org/page/spreadsheet-tools-for-biomarker-incidence-surveys>.

Para cada región, se siguió el mismo algoritmo y se estimó el porcentaje de infecciones recientes y la incidencia estimada de VIH (tabla 12).

9.2 Determinación de los factores de riesgo individuales para la prevalencia e incidencia de VIH entre HSH que acuden a sitios de encuentro.

9.2.1 Descripción de la población de estudio.

De acuerdo con los datos recabados en la encuesta de seroprevalencia de VIH en sitios de encuentro, se conservaron para el análisis descriptivo las variables que se detallan en la tabla 7.

De los ocho bloques de preguntas incluidos en el cuestionario, resultaron 181 preguntas con múltiples respuestas. A conveniencia del estudio, se inició el análisis con 137 preguntas (de aquí en adelante denominadas variables). Se generó una base de datos y se llevó a cabo la limpieza de la misma, eliminando aquellas variables que presentaron más del 15% de datos perdidos. También, se generaron nuevas variables llamadas índices, al conjuntar múltiples variables ampliamente relacionadas; por ejemplo el índice de bienes descrito en metodología. Aquellas variables con múltiples opciones de respuesta, fueron recategorizadas con la finalidad de que cada una de ellas contara tan sólo con cuatro respuestas (de aquí en adelante denominadas categorías). Así mismo, se realizó una recodificación de las variables para trabajar con números asignados a cada categoría. Finalmente, se desarrollaron todos los análisis estadísticos con 21 variables ya recategorizadas y recodificadas. Tal como se mencionó en la metodología, los análisis estadísticos fueron realizados con el programa SPSS *Statistics* versión 23.0.0.2 .

La población analizada presentó diferencias por región geográfica, tanto en características demográficas como de comportamiento sexual. La mayor proporción de participantes se encontró entre los 21-30 años, con el mayor porcentaje en el Sur (60.7%) y el menor en el Noroeste (46.8%). En relación al índice de bienes, el porcentaje de personas en el estrato alto fue mayor en la región CDMX (70.6%) y menor en la región Sur (58.8%). Entre las variables de comportamiento sexual, el 40.1% de la población reportó saber que su última pareja sexual no tenía VIH, con diferencias regionales desde un 36.6% en CDMX hasta un 53.1% en el Sur. Para el tipo de rol sexual, el 27.8% reportó un rol activo en sus tres últimas relaciones, siendo entre el Noroeste (31.5%) y el Centro (25.3%) las regiones con las mayores diferencias.

VARIABLE	CATEGORÍAS	TOTAL	%	REGIONES						VALOR p
				CDMX Y ÁREA CONURBADA	SUR	CENTRO	NORESTE	NOROESTE	OCCIDENTE	
EDAD (años)	41 ó más	626	9.2	9.2	6.0	5.2	14.6	15.2	5.0	<0.001 ^a
	31-40	1285	18.8	19.8	10.7	14.6	22.8	23.4	15.7	
	21-30	3694	54.0	54.6	60.7	55.5	48.9	46.8	58.1	

	18-20	1231	18.0	16.4	22.7	24.7	13.6	14.5	21.2	
ÍNDICE DE BIENES	Bajo	716	10.5	8.9	19.6	11.5	11.6	13.8	8.8	
	Medio	1499	22.1	20.4	21.6	24.8	25.3	23.5	21.0	<0.001 [§]
	Alto	4583	67.4	70.6	58.8	63.7	63.2	62.6	70.2	
SERVICIO DE SALUD (utilizado en caso de necesidad)	Capasit	68	1.0	1.0	1.0	1.1	1.2	1.2	0.4	
	Servicio de gobierno	1096	16.1	17.2	19.3	13.2	14.0	11.9	19.1	<0.001 [§]
	Servicio privado	842	12.4	13.4	11.7	14.8	9.5	8.8	11.6	
	Ninguno	4806	70.6	68.4	68.0	70.8	75.4	78.1	68.8	
PRUEBAS DE VIH OFRECIDAS* (último año)	6-96	222	3.2	3.2	2.7	1.3	2.4	4.9	5.1	
	1-5	2387	34.9	37.5	33.0	26.8	27.5	40.0	37.5	<0.001 [§]
	Ninguna	4231	61.9	59.4	64.3	71.9	70.1	55.1	57.4	
PRUEBAS DE VIH HECHAS* (último año)	Servicio de gobierno	1998	29.3	31.5	30.4	25.8	24.7	33.1	26.6	<0.001 [§]
	Servicio privado	850	12.5	12.0	15.1	12.1	13.0	13.1	12.8	
	No se hizo prueba	3533	51.9	50.9	47.8	55.7	56.3	48.1	51.9	
	Sitios de reunión	427	6.3	5.7	6.7	6.4	6.0	5.8	8.7	
EDAD DE DEBUT SEXUAL (años)	8-14	1425	21.7	23.1	23.3	18.6	21.0	22.5	19.9	<0.001 [§]
	15-19	3641	55.5	54.7	59.4	59.8	51.7	51.5	59.4	
	20-52	1489	22.7	22.3	17.4	21.6	27.4	25.9	20.7	
GÉNERO DE LAS PAREJAS SEXUALES	Sólo hombres	5913	88.5	89.8	84.9	88.7	83.6	83.2	92.6	<0.001 [§]
	Hombres y mujeres	772	11.5	10.2	15.1	11.3	16.4	16.8	7.4	
SEXO RECOMPENSADO	Sí	1824	26.8	26.8	35.6	24.3	26.6	28.1	25.8	0.008 [§]
	No	4972	73.2	73.2	64.4	75.7	73.4	71.9	74.2	
ESTATUS DE VIH DE LA ÚLTIMA PAREJA SEXUAL	Sé que sí tiene	275	4.3	5.4	3.3	3.0	3.0	4.2	3.5	<0.001 [§]
	No sé si tiene	2197	34.3	36.1	27.1	30.7	35.7	32.9	33.7	
	Creo que no tiene	1369	21.4	22.0	16.5	21.1	21.2	20.8	21.6	
	Sé que no tiene	2569	40.1	36.6	53.1	45.2	40.1	42.2	41.1	
CONOCIDOS CON VIH/Sida	Sí	3747	55.2	61.7	56.5	46.8	46.2	54.8	49.7	<0.001 [§]
	No	3035	44.8	38.3	43.5	53.2	53.8	45.2	50.3	
NÚMERO DE PAREJAS SEXUALES**	11 ó más	117	1.9	2.6	1.2	1.6	1.0	1.4	1.5	<0.001 [§]
	2-10	1859	30.9	33.3	33.6	30.3	25.2	29.1	28.6	
	0 or 1	4044	67.2	64.0	65.2	68.1	73.9	69.5	69.9	
CONSISTENCIA EN EL USO DE CONDÓN ***	1 o 2 veces	959	15.5	15.2	17.2	13.8	14.2	16.4	17.9	<0.001 [§]
	Ninguna	1041	16.8	15.0	23.5	18.9	16.3	20.5	16.1	
	3 veces	4206	67.8	69.8	59.3	67.3	69.5	63.1	66.0	
CONSISTENCIA EN EL ROL SEXUAL***	Pasivo	1447	23.0	22.4	26.2	24.6	24.2	24.1	20.3	0.007 [§]
	Ambos	3102	49.3	50.4	43.5	50.2	45.6	44.4	53.1	
	Activo	1749	27.8	27.2	30.3	25.3	30.1	31.5	26.7	

*Último año. ** Último mes. ***Últimas tres relaciones sexuales. § Estadísticamente significativo.

Tabla 7. Análisis descriptivo de la población de estudio. La tabla detalla las características demográficas y de comportamiento sexual de la población analizada.

9.2.2 Evaluación de factores de riesgo individuales para la prevalencia e incidencia de VIH.

En relación a los factores sociodemográficos asociados a la prevalencia de VIH, los HSH de la región Centro tuvieron 1.7 veces más posibilidades de estar infectados que las personas de la región Occidente; al aumentar la edad se incrementó la posibilidad de estar infectado con VIH y las personas con un bajo índice de bienes tuvieron la mayor probabilidad de estar infectados por VIH. La asistencia a Capasits y el mayor número de pruebas ofrecidas, se asociaron a la frecuencia de VIH. En relación al comportamiento sexual, el inicio temprano de vida sexual (8-14 años), el tener parejas sexuales sólo hombres, el tener conocidos con VIH, así como el saber que la última pareja sexual tenía VIH, fueron factores asociados a la infección, tal como se presenta en la tabla 8.

Al realizar el análisis considerando las infecciones recientes por VIH, los hombres de la región Centro tuvieron casi tres veces más riesgo de tener VIH en relación a la región Occidente; la mayor edad, el inicio temprano de vida sexual y el bajo índice de bienes no fueron factores de riesgo para presentar infección reciente por VIH. Los hombres que tuvieron relaciones sexuales sólo con hombres y los que mencionaron tener el rol sexual pasivo, tuvieron el doble de riesgo de adquirir VIH, aquellas personas que mencionaron conocer a una persona con VIH tuvieron 1.4 veces más riesgo de tener VIH en comparación con aquellos sin conocidos con VIH.

Los resultados muestran que la región presenta diferencias estadísticamente significativas para ambas medidas epidemiológicas. El Sur y el Centro presentaron la mayor asociación con la prevalencia de VIH, en el caso de las infecciones recientes el mayor riesgo se

encontró en la región Centro; la región Sur no fue estadísticamente diferente. La edad y la edad de inicio de vida sexual indican un mayor tiempo de exposición, por lo que la medida de prevalencia de VIH está asociada con dichos indicadores; no así la medición de infecciones recientes. Las personas que asisten a algún Capasits presentaron tanto una asociación con la prevalencia de VIH, como un mayor riesgo de tener infecciones recientes. El saber que la última pareja sexual tenía VIH (estatus de VIH) presentó la asociación más alta (RM=4.3) para el caso de la prevalencia, mientras que para infecciones recientes de VIH no mostró diferencias (RR=0.9). El tener relaciones sexuales sólo con hombres y el rol sexual pasivo, mostraron un mayor riesgo para infecciones recientes por VIH en comparación con prevalencia de VIH. El número de parejas sexuales en el último mes y el reporte de sexo recompensado no mostraron diferencias, tanto en el modelo de prevalencia de VIH como en el de infecciones recientes de VIH. El reporte de uso consistente de condón, no se encontró como un factor protector para VIH.

VARIABLE	CATEGORÍAS	PREVALENCIA	INFECCIONES RECIENTES
		RM _A (IC _{95%})	RR _A (IC _{95%})
REGIÓN	CDMX y área conurbada	1.5 (1.2-1.9)	1.6(0.9-2.8)
	Sur	1.7 (1.1-2.7)	2.1(0.9-5.0)
	Centro	1.7 (1.3-2.4)	2.7(1.5-5.0)
	Noreste	1.3 (1.0-1.9)	1.5(0.8-3.0)
	Noroeste	1.1 (0.7-1.5)	1.4(0.7-2.9)
	*Occidente	1	1
EDAD (años)	41 ó más	2.3 (1.6-3.2)	1.4(0.8-2.6)
	31-40	2.3 (1.7-3.1)	1.3(0.7-2.2)
	21-30	1.7 (1.3-2.2)	1.0(0.7-1.6)
	*18-20	1	1
ÍNDICE DE BIENES	Bajo	1.6 (1.3-2.1)	1.1(0.7-1.9)
	Medio	1.0 (0.8-1.2)	0.7(0.5-1.1)
	*Alto	1	1
SERVICIO DE SALUD	Capasit	8.6 (4.5-16.6)	3.3(0.7-15.3)

(utilizado en caso de necesidad)	Servicio de gobierno	2.1 (1.7-2.5)	1.2(0.8-1.9)
	Servicio privado	1.5 (1.2-1.9)	1.4(1.0-2.2)
	*Ninguno	1	1
PRUEBAS DE VIH OFRECIDAS (último año)	6-96	1.5 (1.0-2.2)	0.8(0.3-2.4)
	1-5	1.3 (1.1-1.6)	1.5(1.0-2.0)
	*Ninguna	1	1
PRUEBAS DE VIH HECHAS (último año)	Servicio de gobierno	2.5 (1.7-3.6)	1.5(0.8-3.0)
	Servicio privado	2.0 (1.3-3.0)	1.7(0.8-3.6)
	No se hizo prueba	2.3 (1.5-3.3)	1.4(0.7-2.8)
	*Sitios de reunión	1	1
EDAD DE DEBUT SEXUAL (años)	8-14	1.6 (1.2-2.0)	1.2(0.7-1.9)
	15-19	1.3 (1.1-1.6)	1.1(0.7-1.7)
	*20-52	1	1
GÉNERO DE LAS PAREJAS SEXUALES	Sólo hombres	1.8 (1.3-2.5)	2.0(1.0-4.1)
	*Hombres y mujeres	1	1
SEXO RECOMPENSADO	Si	1.3 (1.1-1.5)	1.2(0.9-1.7)
	*No	1	1
ESTATUS DE VIH DE LA ÚLTIMA PAREJA SEXUAL	Sé que si tiene	4.3 (3.2-5.9)	0.9(0.4-2.4)
	No sé si tiene	1.7 (1.4-2.0)	1.3(0.9-1.8)
	Creo que no tiene	1.1 (0.9-1.4)	0.9(0.6-1.4)
	*Sé que no tiene	1	1
CONOCIDOS CON VIH/Sida	Si	2.1 (1.8-2.5)	1.4(1.0-2.0)
	*No	1	1
NÚMERO DE PAREJAS SEXUALES (último mes)	11 ó más	1.0 (0.6-1.5)	0.7(0.2-2.4)
	2-10	1.1 (0.9-1.2)	1.3(0.9-1.8)
	*0 ó 1	1	1
CONSISTENCIA EN EL USO DE CONDÓN (últimas 3 relaciones sexuales)	1 ó 2 veces	0.7 (0.6-0.9)	0.7(0.4-1.0)
	Ninguna	0.6 (0.4-0.7)	0.5(0.3-0.8)
	*3 veces	1	1

CONSISTENCIA EN EL ROL SEXUAL (últimas 3 relaciones sexuales)	Pasivo	1.5 (1.2-1.9)	1.9(1.2-3.1)
	Ambos	1.5 (1.2-1.8)	1.7(1.1-2.6)
	*Activo	1	1

Tabla 8. Características sociodemográficas y de comportamiento sexual, y su asociación con prevalencia e infecciones recientes por VIH entre HSH asistentes a sitios de encuentro. RMA: razón de momios ajustada, RRA: razón de riesgos ajustada y IC_{95%}: intervalos de confianza al 95%.

9.3 Determinación de los factores de riesgo regionales para la prevalencia, infecciones recientes e incidencia de VIH en HSH que acuden a sitios de encuentro.

Las variables regionales o ecológicas, surgieron del agrupamiento por regiones de todos los HSH que participaron en la encuesta de seroprevalencia de VIH 2013 (tabla 9). Con el uso de la información recabada en sus cuestionarios y con información adicional externa, se construyeron las variables como se describe a continuación:

- Prevalencia: se calculó con respecto de los resultados del ensayo Combo y la totalidad de HSH de cada región.
- Incidencia estimada: para cada región, con los datos obtenidos del *RITA* generado en este trabajo y descrito con antelación; y con el uso de la fórmula de Hargrove y colaboradores.
- Porcentaje de infecciones recientes: surgió para cada región del número de HSH con infección reciente por VIH, obtenido con el *RITA*.
- Diagnóstico: como numerador el total de HSH que se sabían con VIH, dividido entre el total de HSH positivos a VIH (confirmados en laboratorio).
- Cobertura de TARV (tratamiento antiretroviral): consideró el número de HSH que declararon estar en TARV, entre el total de PVV que conocían su estatus.
- Mortalidad (ponderada): se construyó con información externa, la cual fue tomada del estudio publicado por Bravo-García y Ortíz-Pérez (110). Se consideró la mortalidad de cada ciudad, dentro de la región en cuestión y se calculó un

porcentaje ponderado dependiente del tamaño de la población.

- Carga viral (CV) en monitoreo: se refiere al porcentaje de personas con al menos un dato de CV en el año (2013). Se cálculo de manera ponderada para cada región, con base en los datos estatales publicados en el boletín SALVAR #23 (cierre del 2013) (111).
- Carga viral (CV): resultó del indicador virológico (CV<400 copias/mL) publicado en el boletín SALVAR #23 (cierre del 2013), por estado (111). Este dato fue ponderado con respecto de los estados incluidos en cada región.

REGIÓN	n	PREVALENCIA (%)	INCIDENCIA ESTIMADA (100apo)	INFECCIONES RECIENTES ENTRE PVV (%)	DIAGNÓSTICO (%)	COBERTURA TARV (%)	*MORTALIDAD	** CV EN MONITOREO	***CV
CDMX	3162	20.7 (19.4-22.0)	5.7 (3.2-8.2)	17.8 (15.1-21.0)	41.2 (37.5-45.0)	80.7 (75.6-85.0)	4.6	19.8	59.4
Sur	300	19.0 (15.0-23.8)	6.1 (0-13.7)	19.3 (11.0-31.5)	38.6 (27.0-51.6)	77.3 (56.2-90.3)	7.0	25.2	58.0
Centro	963	16.9 (14.7-19.4)	11.6 (6.6-16.6)	29.4 (23.0-36.9)	22.1 (16.4-29.1)	80.6 (64.7-90.6)	4.1	35.8	61.5
Noreste	779	13.5 (11.3-16.1)	3.5 (0-7.1)	18.1 (11.8-26.6)	28.6 (20.8-37.9)	90.0 (73.6-97.3)	4.0	29.5	53.5
Noroeste	697	14.9 (12.5-17.8)	5.6 (1.2-10.0)	21.2 (14.3-30.0)	29.8 (21.8-39.2)	77.4 (59.9-88.9)	5.4	13.7	52.6
Occidente	939	11.5 (9.6-13.7)	4.9 (1.6-8.3)	23.1 (16.2-32.0)	30.6 (22.6-39.8)	90.9 (75.7-97.6)	2.8	34.7	64.3
Nacional	6840	17.4 (16.6-18.4)	6.2 (4.4-7.9)	20.3 (18.1-22.7)	35.4 (32.7-38.1)	81.8 (77.8-85.2)	4.2	29.1	59.7

Tabla 9. Estimaciones de prevalencia, incidencia e infecciones recientes y su relación con la cascada de atención de VIH; por región. Donde n: número de muestras, apo: años-persona-observación, PVV: personas que viven con VIH, TARV: tratamiento antiretroviral y CV: carga viral.

En la tabla 9 se presenta la prevalencia, el porcentaje de infecciones recientes entre PVV, la incidencia estimada, la cobertura de la terapia antirretroviral y la mortalidad; todas a nivel nacional y regional. La prevalencia nacional de VIH fue de 17.4% con diferencias entre regiones; la más alta se obtuvo en CDMX con 20.7% y la más baja en Occidente 11.5%. El porcentaje nacional de infecciones recientes entre PVV fue de 20.3%; entre regiones geográficas, el porcentaje más alto se encontró en el Centro 29.4% y el más bajo en CDMX. La incidencia nacional estimada se calculó en 6.2 por 100 personas-año, siendo

el Centro, la región que reportó los datos más altos con un 11.6 por 100 personas-año y el más bajo en el Noreste con 3.5 por 100 personas-años. La cobertura de TARV fue de 81.8% a nivel nacional, con diferencias de 77.3% en el Sur a 90.9% en el Occidente (Ver la figura 25 y tabla 9).

Al considerar las variables por región como representativas de las etapas del continuo de atención al VIH, surgen escenarios regionales distintos; los cuales muestran que las estimaciones de prevalencia, infecciones recientes e incidencia se explican con las variables agrupadas. Es decir que las variables o factores agrupadas (os) que explican la transmisión del VIH en nuestra población de estudio son diferentes para cada región geográfica.

Para la CDMX se encontró el menor porcentaje de infecciones recientes y esto responde a su alto porcentaje de diagnóstico (41.2%). Lo anterior implica que son más las personas diagnosticadas y entonces estas entran al continuo de atención al VIH, una vez dentro la TARV y con apoyo de la prevención con positivos se disminuye la transmisión del virus. En el caso del Sur, encontramos que la prevalencia y el porcentaje de infecciones recientes son similares (19% vs 19.3%) lo que quiere decir que la supervivencia de las PVV es muy baja. Esto se explica debido a la baja cobertura de TARV (77.3%, la menor de todas) y en consecuencia a la alta mortalidad en dicha región (7.0, la más alta de todas). La región Centro resultó con el más alto porcentaje de infecciones recientes (29.4%) y esto podría ser consecuencia del bajo porcentaje de diagnóstico (22.1%), lo que hace que las personas desconozcan su estatus y por ende continúen con su vida sexual y esto aumenta la transmisión del VIH. La transmisión permanece alta a pesar de que la CV en monitoreo (35.8%, proxy de la retención) es la más alta en esta región. Para el Noreste se encontró que la prevalencia, incidencia e infecciones recientes fueron muy bajos, se podría decir que es la región que se encuentra mejor en cuanto a estos estimadores. En esta región a pesar de que su diagnóstico no es tan alto (28.6%), su cobertura de TARV es la segunda más alta (90%) que de hecho cumple con la estrategia 90-90-90. Así también, su retención en cuidado (CV monitoreo, 29.5%) es muy alta lo que podría disminuir la transmisión viral.

En el Noroeste el porcentaje de infecciones recientes es alto (21.2%) lo que podría deberse a un bajo porcentaje de diagnóstico (29.8%), una baja cobertura de TARV (77.4%), variables que impactan en las últimas etapas del continuo que es la retención en cuidado (CV monitoreo, 13.7%) y supresión viral (CV, 52.6%) que son los menores datos para todas las regiones. Finalmente, en la región Occidente se encontró un alto porcentaje de infecciones recientes (23.1%) a pesar de que su porcentaje de diagnóstico es promedio (30.6%). Sin embargo, esta región resultó con la mayor cobertura de TARV (90.9%) lo que podría ser causante de su alto porcentaje de CV (64.3% el más alto de todos, proxy supresión viral) (Tabla 9).

La siguiente figura detalla las seis regiones geográficas analizadas y resalta el escenario de transmisión para cada una con respecto de la prevalencia, porcentaje de infecciones recientes, mortalidad y cobertura de TARV (figura 25).

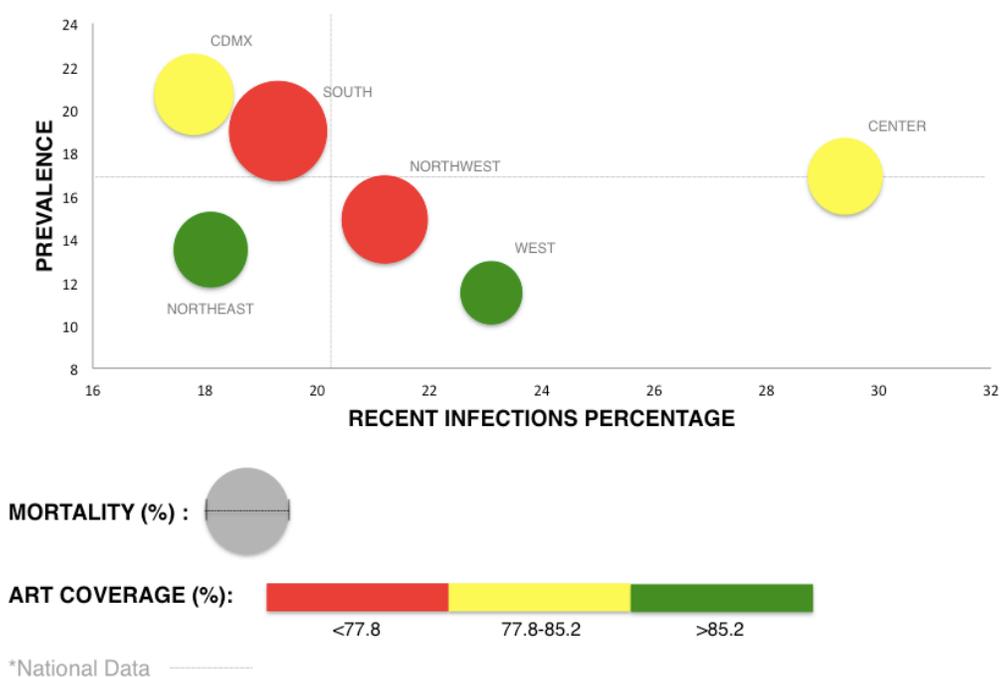


Figura 25. Gráfica de escenarios de transmisión de VIH por región, de acuerdo con las variables de la cascada de atención al VIH. De acuerdo con las variables agrupadas, le región Sur se destaca como la región con mayor necesidad en atención a las personas con VIH. En contraparte, la región Noroeste figura como la región con un mejor estado general en la atención al VIH. Cabe destacar que los resultados presentados en el gráfico, representan únicamente los hallazgos para

el año 2013 (año de la encuesta), lo que sugiere que el escenario para cada región puede ser diferente en la actualidad.

9.4 Metodología molecular para la diferenciación de infecciones por VIH recientes y no recientes.

La parte de la metodología molecular propuesta en este proyecto se inició con el objetivo de obtener el material biológico para la amplificación de un fragmento de VIH. Con este material se dio inicio a la estandarización del ensayo qPCR y *HRM* para diferenciar molecularmente las infecciones por VIH recientes de las no recientes. Para ello, se llevó a cabo una extracción de DNA a partir de diferentes muestras biológicas.

9.4.1 Extracción de DNA a partir de plasma.

La metodología molecular se inició con muestras de plasma de hombres que tienen sexo con hombres (HSH) positivos a VIH provenientes de la Clínica Especializada Condesa (CDMX). El DNA extraído del plasma se utilizó inicialmente para la estandarización de la técnica de qPCR para amplificar un fragmento de VIH (la cual se detallará más adelante). La extracción de DNA se realizó con dos técnicas de extracción: estuche comercial de columnas de intercambio iónico ZYMO Research y Fenol/Cloroformo. A continuación se detallan los resultados de las extracciones de plasma con ambos protocolos.

MUESTRA	ZYMO research		Fenol/Cloroformo	
	[DNA] ng/μL	A260/280	[DNA] ng/μL	A260/280
R1	0	3.81	47.1	1.07
R2	0	5.7	90.3	1.13
R3	0	6.63	240.8	1.25
R4	0	18.31	166.1	1.08
R5	0	1.13	9.9	1.18
R6	0	3.15	137.9	0.94
R7	0	2.55	85.0	0.88
C1	0	5.36	11.6	0.96
C2	0	1.23	173.5	0.76
C3	0	2.0	103.6	1.07
C4	0	2.79	151.3	0.86
C5	0.7	0.89	90.9	0.90
C6	0	2.34	87.4	0.94
C7	0	1.97	31.7	0.90

Tabla 10. Resultados de extracción de DNA, a partir de plasma con el estuche comercial ZYMO Research (columna 2) y

con el protocolo Fenol/Cloroformo (columna 4).

9.4.2 RNA a partir de plasma.

Se realizó también una modificación al material biológico a partir del cual se iniciarían los ensayos de qPCR. Se decidió llevar a cabo una extracción de RNA a partir de muestras de plasma fresco.

El RNA se extrajo con el estuche comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit® de QIAGEN, el procedimiento se detalla en el ANEXO 9. De manera breve, el protocolo se inicia con 140 μ l de plasma al cual se le adiciona un *buffer* preparado con una solución acarreadora del RNA, la que se incuba por 10 minutos para lograr la lisis de la partícula viral. Posteriormente, se añade etanol absoluto y la mezcla completa se coloca en una mini-columna provista por el estuche comercial. Mediante centrifugación se hace pasar la solución a través de la membrana en la mini-columna, de manera que el RNA se fije en esta. Se llevan a cabo dos lavados con dos diferentes *buffers* provistos por el fabricante (uno de ellos contiene guanidina). Finalmente se lleva a cabo una elución del RNA que yacía en la membrana de la columna, esto último con un *buffer* específico (provisto por el estuche comercial) para eluir el material biológico de interés. Al igual que en los protocolos de extracción de DNA, el RNA obtenido se cuantificó en un equipo NanoDrop™ Lite Spectrophotometer.

Las muestras utilizadas formaron parte de un panel de 102 muestras de plasma fresco provistas por la Clínica Especializada Condesa, provenientes de HSH VIH positivos con un estatus de infección conocido. Estas muestras se procesaron en 4 bloques (1 de 30 y 3 de 24). De todas las muestras se obtuvo RNA, para el bloque 1 se obtuvieron concentraciones de entre 26.9-63.1 ng/ μ L, para el 2 de 15.8-68.5 ng/ μ L, para el 3 de 33.0-51.1 ng/ μ L y para el 4 de 21.8-56.5 ng/ μ L (valor mínimo y máximo de concentración obtenido en cada bloque, respectivamente).

A partir del RNA extraído, se llevó a cabo una amplificación de un fragmento del VIH mediante un PCR en tiempo real con reverso transcripción (RT-qPCR). El cual será descrito

posteriormente.

9.4.3 PCR tiempo real (qPCR) para la amplificación de un fragmento de VIH.

La amplificación de un fragmento de VIH permite corroborar la presencia del virus en el fluido biológico utilizado. Específicamente para este trabajo, se estandarizó un qPCR para la detección del VIH con uso de un agente intercalante *SYBR Green*, y una vez con este ensayo, estandarizar una técnica para discernir entre infecciones recientes y no recientes por VIH. Con los resultados de ello, se pretende mejorar el algoritmo de pruebas para infecciones recientes detallado con anterioridad (*RITA* con información clínica y pruebas serológicas).

9.4.4 Elección del fragmento de VIH para la amplificación: *pol*.

Tal como se detalló en la sección de metodología, se realizó un análisis de los oligonucleótidos publicados para un fragmento de cada uno de los genes estructurales del VIH (tablas 11-13). Enseguida se muestran los análisis:

GAG2 (p6/TF) amplicón de 211pb		
CARACTERÍSTICAS	FORWARD	REVERSE
Secuencia (5'-3')	ACTGAGAGACAGGCTAATTTTTAG	GGTCGTTGCCAAGAGTGATTTG
Tamaño (pb)	25	23
T _m (°C)	52.9	56.9
GC (%)	36	47.8
Hairpin (Kcal/mol)	1 (-2.61)	3 (-0.61, -0.1 y 0.16)
Homodímeros (Kcal/mol)	14 (mal 1 de -5.36 / los demás de -4.5 a -0.96)	11 (mal 1 de -5.84 / los demás de -3.9 a -1.47)
Heterodímeros (Kcal/mol)	21 (mal 1 de -6.21 / los demás de -3.89 a -1.34)	
BLAST	Solo VIH-1	

Tabla 11. Análisis del fragmento GAG2, donde en rojo se muestran las características que se encuentran en el límite del diseño óptimo. Se considera un par de oligonucleótidos adecuado, sin embargo es necesario realizar una disminución del tamaño del amplicón.

POL 3 (integrasa) amplicón de 139pb		
CARACTERÍSTICAS	FORWARD	REVERSE
Secuencia (5'-3')	TAAAAGAAAAGGGGGGATTGG	TCTGCTGTCCCTGTAATAAACC
Tamaño (pb)	21	22
T _m (°C)	52.8	54.4
GC (%)	42.9	45.5
Hairpin (Kcal/mol)	7 (de 1.66 a 2.14)	1 (0.26)
Homodímeros (Kcal/mol)	8 (-1.94 a -0.96)	7 (-3.14 a -0.96)
Heterodímeros (Kcal/mol)	23 (mal 4 de -7.74, -7.71, -6.14 y -6.14 / los demás de -3.42 a -0.96)	
BLAST	Solo VIH-1	

Tabla 12. Análisis del fragmento POL3, donde en rojo se muestran las características que se encuentran en el límite del diseño óptimo. Se considera un par de oligonucleótidos adecuado, y no requiere disminución de tamaño porque cumple con el ideal para qPCR (60-150pb).

ENV1 (gp41 HR1) amplicón de 239pb		
CARACTERÍSTICAS	FORWARD	REVERSE
Secuencia (5'-3')	CAGCAGGWAGCAACKATGGG	GCARATGWGYTTTCCAGAGCADCC
Tamaño (pb)	19	24
T _m (°C)	Min 55.1 / Mean 57 / Max 58.9	Min 56.8 / Mean 59.4 / Max 62.6
GC (%)	60.5	51.4
Hairpin (Kcal/mol)	1 (-1.49)	2 (0.49 y 0.89)
Homodímeros (Kcal/mol)	13 (de -3.87 a -1.27)	24 (mal 4 de -6.69, -5.79, -5.64 y -5.09 / los demás de -4.01 a -1.57)
Heterodímeros (Kcal/mol)	23 (mal 4 de -9.49, -6.69, -5.98 y -5.02 / los demás de -4.7 a -1.27)	
BLAST	VIH-1 y virus de inmunodeficiencia en simios	

Tabla 13. Análisis del fragmento ENV1, donde en rojo se muestran las características que se encuentran en el límite del diseño óptimo. Se considera un par de oligonucleótidos adecuado, sin embargo es necesario realizar una disminución del tamaño del amplicón.

Como los amplicones para GAG y ENV superaban el tamaño óptimo para un ensayo de

qPCR, estos se redujeron y se propusieron los nuevos amplicones. Esto se llevo a cabo con el uso del programa PrimerQuest Tool de IDT Tools disponible en http://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Details/0_2, en la opción qPCR para agentes intercalantes. El propósito fue el de generar un amplicón más pequeño dentro de los que ya se encuentran publicados, y llevar a cabo el análisis de los oligonucleótidos resultantes. Para el amplicón GAG2, se tomó la secuencia original (211pb) y se generó un amplicón interno de 135pb (Figura 26). Una vez con el fragmento interno, se llevo a cabo el análisis de sus oligonucleótidos diseñados (Tabla 14).

actgagagacaggctaatttttaggaagatctggccttctacaaggaaggccaggggaatttcttcagagcagacc
agagccaacagccccaccagaagagagcttcaggtctgggtagagacaacaactccccctcagaagcaggagccg
atagacaaggaactgtatccttaacttcctcaggtcactctttgccaacgacc

Figura 26. Amplicón diseñado para GAG2. En azul se muestran los oligonucleótidos para la secuencia original (211pb) y en rojo los oligonucleótidos del amplicón interno (135pb).

GAG2 (p6/TF) amplicón de 135pb		
CARACTERÍSTICAS	FORWARD	REVERSE
Secuencia (5'-3')	<u>gaagatctggccttctacaag</u>	<u>tctatcggctcctgcttct</u>
Tamaño (pb)	22	19
T _m (°C)	54.9	55.2
GC (%)	50	52.6
Hairpin (Kcal/mol)	-0.33, -0.31 y .31	-0.97
Homodímeros (Kcal/mol)	-9.28, -7.82, -5.12, 9 de -3.54 a -0.96	7 de -3.61 a -0.96
Heterodímeros (Kcal/mol)	-6.21, 18 de -3.54 a -1.57	
BLAST	Solo VIH	

Tabla 14. Análisis de los oligonucleótidos internos para GAG2. En rojo se muestran las características que se encuentran en el límite del diseño óptimo. Sin embargo fue el mejor diseño posible dado el tamaño de la secuencia base.

Así mismo, para el amplicón ENV1 se tomó la secuencia original (239pb) y se generó un amplicón interno de 119pb (Figura 27). Una vez con el fragmento interno, se llevo a cabo

el análisis de sus oligonucleótidos (Tabla 15).

cagcaggaagcactatgggCGCagcctcaatgacgctgacggtaCaggccagacaattattgtctggtatagtcagca
 gcagaacaa**tttgctgagggctattgagg**cgcaacagcatctgttgaactcaCagctggggcatcaagcagctccag
gcaagaatcctggctgtggaagatacctaaaggatcaacagctcctggggattggggtgctctggaaaactcattg
 C

Figura 27. Amplicón diseñado para ENV1. En azul se muestran los oligonucleótidos para la secuencia original (239pb) y en rojo los oligonucleótidos del amplicón interno (119pb).

ENV1 (gp41 HR1) amplicón de 119		
CARACTERÍSTICAS	FORWARD	REVERSE
Secuencia (5'-3')	<u>tttgctgagggctattgagg</u>	<u>ccaggagctgttgatccttag</u>
Tamaño (pb)	20	22
T _m (°C)	54.9	55.2
GC (%)	50	50
Hairpin (Kcal/mol)	-1.27	-0.83, -0.26 y -0.08
Homodímeros (Kcal/mol)	9 de -3.14 a -0.96	-6.34, -6.24, 7 de -4.62 a -0.96
Heterodímeros (Kcal/mol)	15 de -4.74 a -1.47	
BLAST	VIH-1 y virus de inmunodeficiencia en simios	

Tabla 15. Análisis de los oligonucleótidos internos para ENV1. En rojo se muestran las características que se encuentran en el límite del diseño óptimo. Sin embargo fue el mejor diseño posible dado el tamaño de la secuencia base.

De los fragmentos analizados y modificados, el elegido para la amplificación de VIH fue el correspondiente al gen *pol* (uno de los tres estructurales del virus). El fragmento amplificado se encuentra en la secuencia que codifica para la integrasa del VIH, proteína responsable de la integración del genoma viral al genoma del hospedero. Este fragmento se eligió de entre los publicados por Cousins y colaboradores en sus artículos sobre la estandarización del ensayo *HRM* para VIH; en dichas publicaciones se le llamo POL3 (115). A pesar de que el fragmento publicado cumplía con el tamaño adecuado para el qPCR

139pb (figura 28), y de que el análisis bioinformático de los oligonucleótidos para su amplificación mostró un diseño óptimo de los mismos; su T_m se encontró entre 72-74°C; lo que podría ocasionar problemas al diferenciar el producto amplificado de los dímeros de oligonucleótidos (que usualmente se presentan en ese mismo intervalo de temperatura).

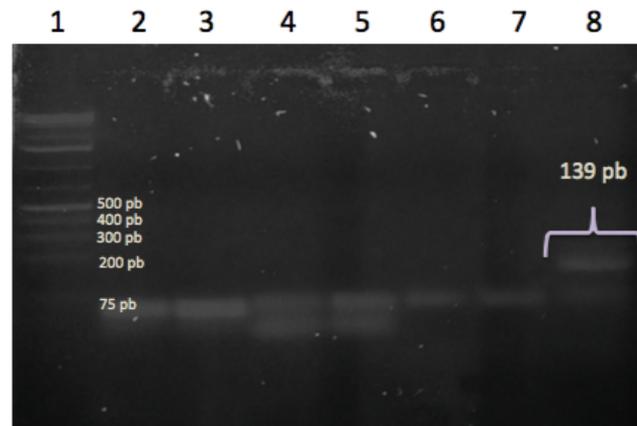


Figura 28. Confirmación de tamaño del fragmento de interés de *pol* 139pb VIH. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular de 1Kb (GeneRuler™ 1Kb Plus DNA ladder), carriles 2-5 y 7 DNA de plasma con resultados sin amplificación de producto, carril 6 control negativo (agua) y carril 8 muestra positiva a *pol* 139pb a partir de producto de PCR mrt2000 (dilución 1:10). Condiciones: electroforesis en gel de agarosa al 2%, preparación y corrimiento en buffer TAE [1X] con 1µL de Bromuro de Etidio, 30 minutos a 75mV; revelado en transiluminador.

Debido a lo anterior, el fragmento se amplió de 139 a 199pb a partir de un alineamiento de aproximadamente 2000 secuencias parciales de “HIV-1 *pol* gene Mexico”, en el programa Mega.7.0.14 (124). La T_m teórica del nuevo fragmento se calculó en 79.04°C. A continuación se detallan los oligonucleótidos diseñados para este propósito y el

fragmento amplificado (figuras 29 y 30, tabla 16).

taaaagaaaaggggggattggggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatac
aaactaaagaattacaaaaacaattacaaaaattcaaaatcttcgggtttattacagggacagcagaaat
ccactttggaaaggaccagcaaagctcctctggaaagg**gtgaaggggcagtagtaata**

Figura 29. Amplicón de *pol* VIH de 199pb. En amarillo se encuentra marcado el oligonucleótido *forward* flanqueando al fragmento amplificado en negritas. En rojo se muestra el nuevo oligonucleótido *reverse*.

Como oligonucleótido *forward* se mantuvo el mismo publicado por Cousins y colaboradores. La ampliación del fragmento conllevó el diseño de un nuevo oligonucleótido *reverse*, el cual fue diseñado con el programa Primer Blast disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. El análisis de este par de oligonucleótidos obtenido con el software OligoAnalyzer 3.0 se muestra a continuación.

<i>pol</i> (integrasa) amplicón de 199pb		
CARACTERÍSTICAS	FORWARD	REVERSE
Secuencia (5'-3')	TAAAAGAAAAGGGGGGATTGG	TATTACTACTGCCCTTCAC
Tamaño (pb)	21	20
T _m (°C)	52.8	51.1
GC (%)	42.9	45.0
Hairpin (Kcal/mol)	7 (de 1.66 a 2.14)	4 (de 1.58 a 2.12)
Homodímeros (Kcal/mol)	8 (de -1.94 a -0.96)	8 (de -3.14 a -0.96)
Heterodímeros (Kcal/mol)	24 (de -12.75 a -0.96)	
BLAST	Solo VIH-1	

Tabla 16. Análisis del nuevo fragmento *pol* de 199pb, se muestran las características de los oligonucleótidos y en rojo se encuentran aquellas en el límite del diseño óptimo.

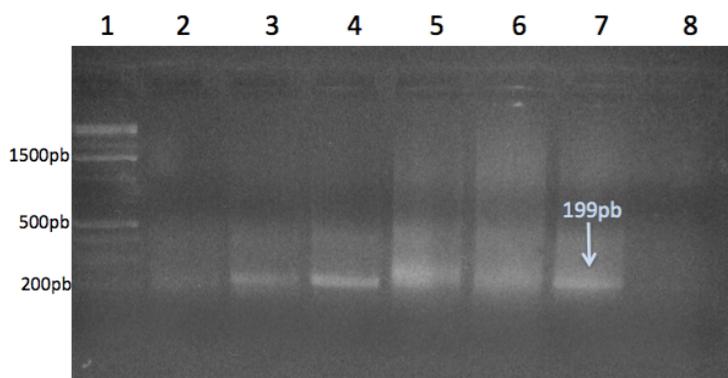


Figura 30. Confirmación de tamaño del nuevo fragmento de interés de *pol* 199pb VIH. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular de 1Kb (GeneRuler™ 1Kb Plus DNA ladder), carriles 2-7 muestras positivas a *pol* 139pb a partir de producto de PCR mrt2000, carril 8 control negativo (agua). Condiciones: electroforesis en gel de agarosa al 2%, preparación y corrimiento en buffer TAE [1X] con 1 μ L de Bromuro de Etidio, 30 minutos a 100mV; revelado en transiluminador.

Una vez con el par nuevo de oligonucleótidos, se procedió a la estandarización del qPCR. El programa utilizado para el qPCR a partir de DNA, así como las mezclas de reacción utilizadas se detallan en la sección de anexos (ANEXO 10). Enseguida se muestran la curva de amplificación, la estándar y la de disociación obtenidas en la estandarización del ensayo (figuras 31-33).

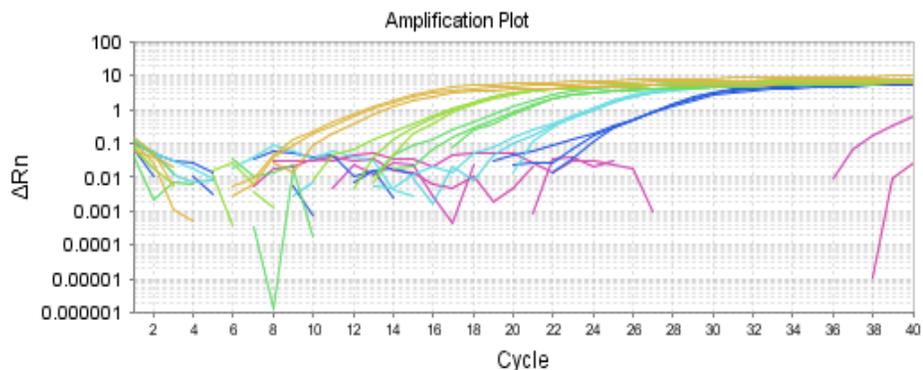


Figura 31. Curva de amplificación de qPCR *pol* 199pb (DNA), a partir de 5 diluciones de *pol*-VIH. Cada color representa una dilución, y estas van por triplicado: amarillo dilución 1 (1:10) Ct 12.3, color lima dilución 2 (1:100) Ct 16.4, verde claro dilución 3 (1:1,000) Ct 19.4, color aqua dilución 4 (1:10,000) Ct 23.2, azul dilución 5 (1:100,000) Ct 26.7 y en rosa se muestra el NTC Ct indeterminado.

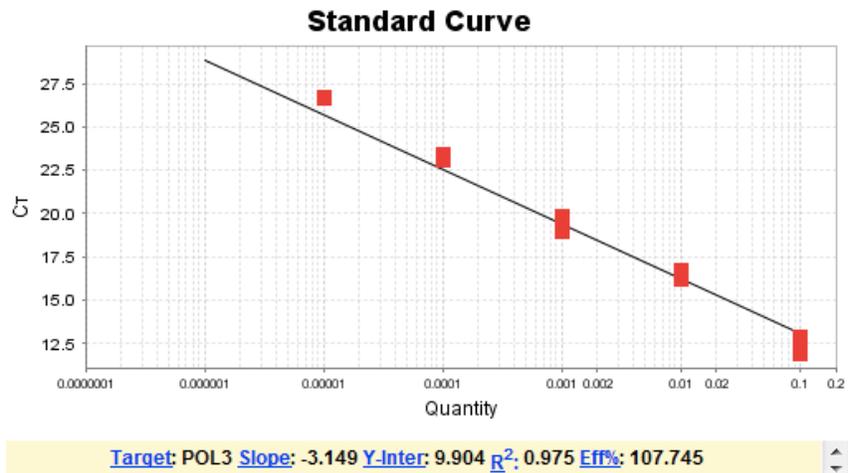


Figura 32. Curva estándar de qPCR *pol* 199pb (DNA), a partir de 5 diluciones. En el caso del PCR tiempo real a partir de DNA, se realizó una curva estándar con material genético de concentración conocida para determinar la eficiencia de la reacción. En la figura se muestra que la eficiencia de la reacción fue de 107.7% (óptima).

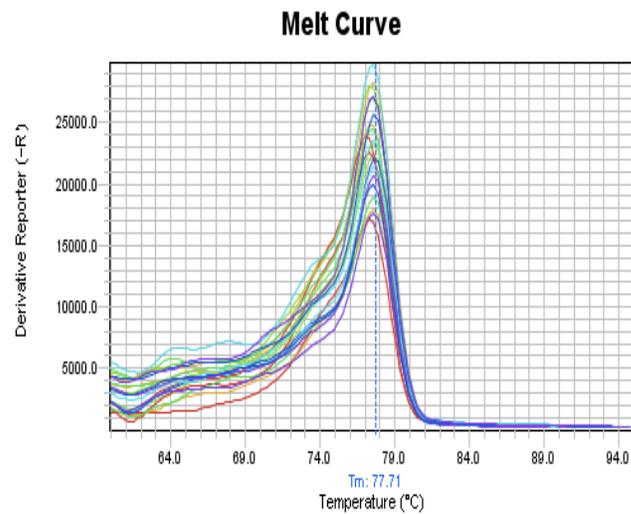


Figura 33. Curva de disociación de qPCR *pol* 199pb (DNA). En la figura se muestra que la T_m experimental del producto amplificado resultó de 77.71°C (mayor a la obtenida con el amplicón de 139pb), aunque no se alcanzó la T_m teórica calculada, que era de 79.04°C.

Durante el procesamiento de las muestras problema a partir de DNA, se obtuvieron Tms del producto amplificado con diferencias mayores de 0.5°C con respecto de la Tm obtenida del amplicón de referencia (en el ensayo de estandarización y el procesamiento de muestras problema); intervalo aproximado de Tm's de 77.0 a 80.6°C (según datos del sistema acoplado al equipo de PCR tiempo real) (figura 34). En los ensayos de qPCR, de manera convencional se considera aceptable una variación máxima de Tm de no más de 0.5°C para corroborar la especificidad del amplicón generado.

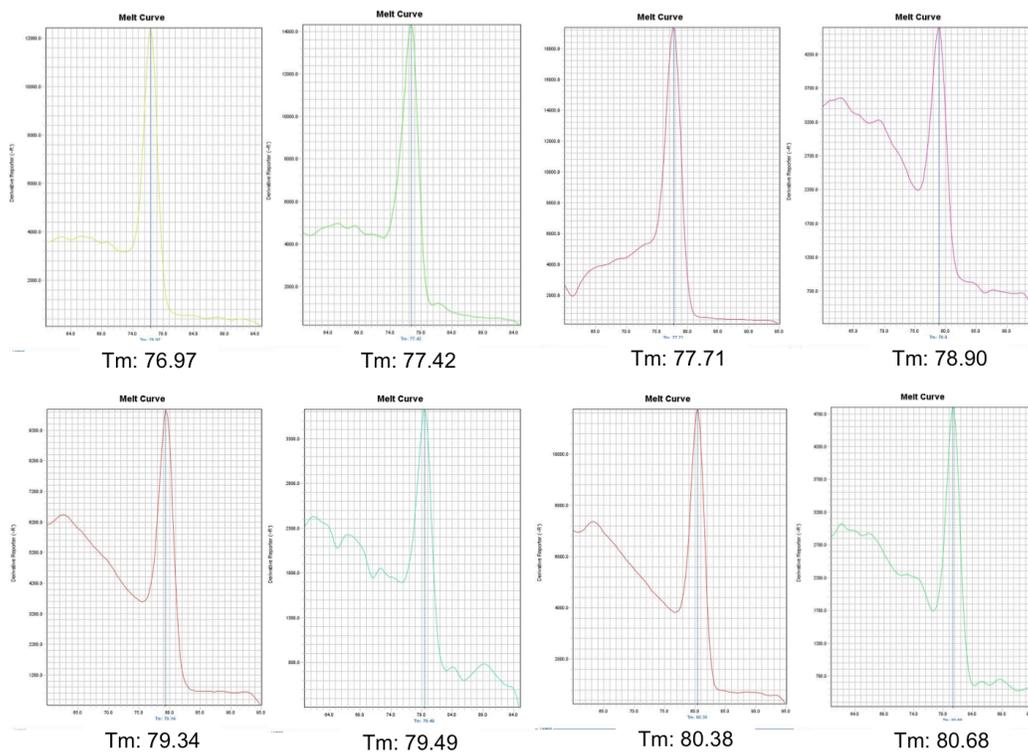


Figura 34. Curvas de disociación de *pol* 199pb con diferentes Tm's. Se muestran curvas obtenidas a partir de DNA y RNA. En cada una se detalla la Tm del producto, las cuales van desde 76.97°C hasta 80.68°C. El tercer panel superior (izquierda a derecha) corresponde al producto purificado de *pol* 199pb en el ensayo de estandarización de qPCR.

Como los resultados obtenidos mostraron diferencias en T_m mayores a lo comúnmente aceptado, lo cual podía ser consecuencia de la diversidad genética en el fragmento. Para confirmar este resultado y comprobar que lo encontrado no era producto de errores en la técnica, se decidió realizar el proceso de amplificación de *pol* 199 pb a partir de RNA. El programa de RT-qPCR y la mezcla de reacción utilizada se describe en el ANEXO 11. Las figuras siguientes muestran los resultados obtenidos con este material genético (figuras 35 y 36).

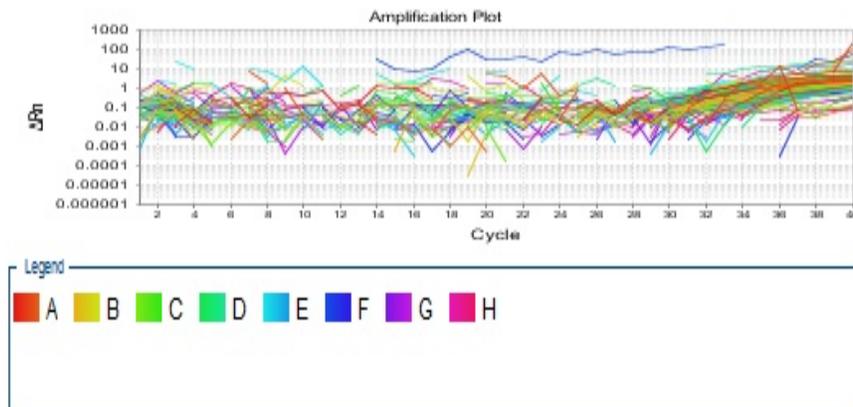


Figura 35. Curva de amplificación de RT-qPCR (RNA), ejemplo bloque 1.

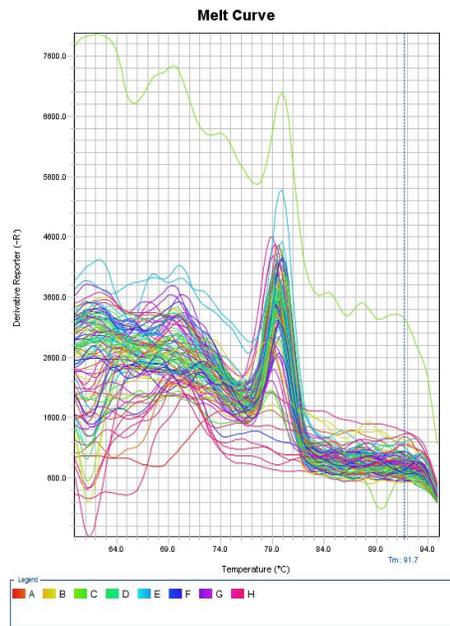


Figura 36. Curva de disociación de RT-qPCR (RNA), ejemplo bloque 1.

El panel de muestras de plasma obtenidas de la Clínica Especializada Condesa (n= 102), fue procesado para la extracción de RNA de acuerdo a lo descrito en la sección de metodología. Así mismo, las muestras fueron procesadas por medio de RT-qPCR de acuerdo a lo detallado en el ANEXO 11. Se procesó igualmente que en la extracción, en cuatro bloques de amplificación (bloque 1 n= 30, bloque 2 n= 24, bloque 3 n= 24 y bloque 4 n=24); cada muestra por triplicado.

9.4.5 Análisis de las curvas de disociación y secuenciación de los productos.

A partir de los ensayos de RT-qPCR, igualmente que el procesamiento con DNA, se obtuvieron Tm's diferentes entre los productos generados. Para evaluar la especificidad de estos, los productos del RT-qPCR resultantes del panel de Clínica Condesa se recuperaron y se realizó con ellos una electroforesis en gel de agarosa para corroborar el tamaño de banda (199pb). De cada uno de los bloques de procesamiento, se eligieron para secuenciar aquellas muestras que resultaron con mayores diferencias en Tm, igualmente para confirmar la especificidad del producto amplificado. Finalmente se

enviaron 27 muestras para su secuenciación, las 4 correspondientes a infecciones recientes (3 recientes y 1 aguda) y 23 de larga duración (figura 37).

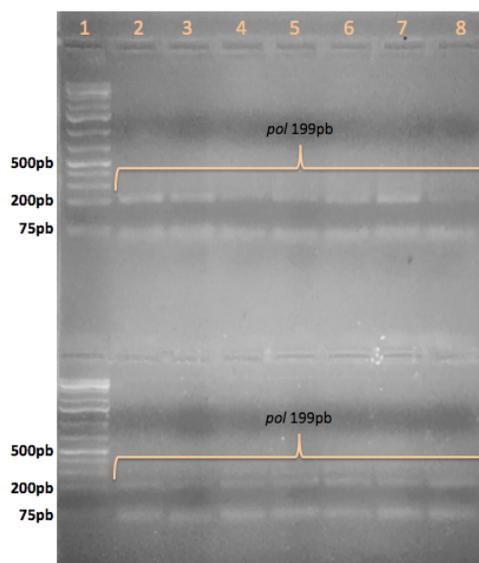


Figura 37. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de RT-qPCR de *pol* 199pb, ejemplo bloque 4.

Las muestras fueron preparadas y enviadas a la unidad de síntesis y secuenciación al Instituto de Biotecnología de la UNAM, Campus Cuernavaca. De acuerdo con las instrucciones para la secuenciación, cada muestra se purificó a partir de su banda en el gel de agarosa y se recuperaron de 100-120ng de DNA para su procesamiento final, además de añadir 10pmoles/ μ L de oligonucleótido específico. Se utilizó para este propósito el estuche comercial DNA Extraction Kit Pure ExtremeTM de Fermentas, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada una de las muestras fue enviada por duplicado, una de ellas con el oligonucleótido *forward* y la otra con el *reverse*.

Los electroferogramas resultantes de la secuenciación (archivos .ab1) fueron visualizados inicialmente con el programa 4peaks disponible en <https://nucleobytes.com/4peaks/index.html>. Posteriormente, se realizó un curado de las secuencias (ediciones en minúscula) y se obtuvo la secuencia consenso de cada uno de los

27 amplicones con el ensamblador de secuencias Staden Package (125,126) disponible en <http://staden.sourceforge.net/>.

Con estas secuencias nucleotídicas se llevó a cabo un análisis tipo Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), con el cual se corroboró que todas las secuencias a pesar de presentar variaciones amplias en la Tm si correspondían al producto de interés: *pol* 199 pb de VIH (figura 38).



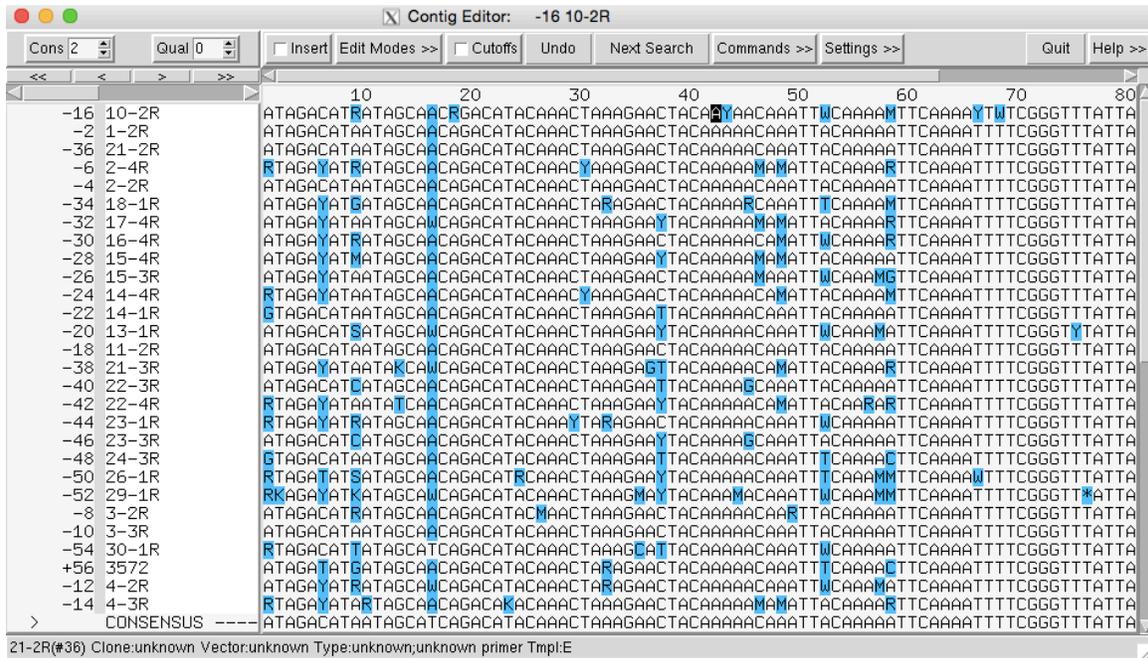


Figura 38. Secuencias obtenidas de los productos de amplificación. Se muestran dos capturas de pantalla donde se aprecian las secuencias recibidas, y en azul los posibles polimorfismos. Confirmación de que el producto de *pol* 199pb puede tener variaciones de Tm mayores a lo establecido en la teoría del qPCR (0.5°C).

A continuación se muestra el alineamiento de las secuencias en el programa Clustal Omega (CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment):

```

21-3      TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAATAGAYATAATAK 60
22-3      TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAATAGACATCATAG 60
23-3      TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAATAGACATCATAG 60
24-3      TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAAGTAGACATAATAG 60
13-1      TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAATAGACATSATAG 60
14-1      TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAAGTAGACATAATAG 60
18-1      TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGRTACAGTGCAGGGGAAAGAATAATAGAYATGATAG 60
23-1      TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGRTACAGTGCAGGGGAAAGAATARTAGAYATRATAG 60
26-1      TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGRTACAGTGCAGGRSAAAGAATARTAGAYATSATAG 60
29-1      TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGTA CRGTGCAGGGGAAAGAATAARKAGAYATKATAG 60
30-1      TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGTA CAGTGCAGGGGAAAGAATARTAGACATTATAG 60
1-2       TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAGAGAATAATAGACATAATAG 60
2-2       TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAGAGAATAATAGACATAATAG 60
3-2       TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGARAGAATAARTAGACATRATAG 60
4-2       TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGRTACAGTGCAGGGGARAGAATAATAGAYATRATAG 60
10-2      TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAGAGAATAATAGACATRATAG 60
11-2      TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAGAGAATAATAGACATAATAG 60
21-2      TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGARAGAATAATAGACATAATAG 60
3-3       TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGARAGAATAATAGACATAATAG 60
4-3       TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATARTAGAYATARTAG 60
15-3      TTWAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAATAGAYATAATAG 60
2-4       TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATARTAGAYATRATAG 60
14-4      TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATARTAGATATAATAG 60
15-4      TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGRTACAGTGCAGGRRGAAAGAATAATAGAYATMATAG 60
16-4      TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGARAGAATAATAGAYATRATAG 60
17-4      TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGARAGAATAATAGAYATAATAG 60
22-4      TTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTAYAGTGCAGGGGARAGAATARTAGAYATRAYAG 60
** ***** ***** ** ***** * ***** *** ** *

```


21-3	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
22-3	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
23-3	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
24-3	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
13-1	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
14-1	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
18-1	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
23-1	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
26-1	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
29-1	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
30-1	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
1-2	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
2-2	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
3-2	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
4-2	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
10-2	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
11-2	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
21-2	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
3-3	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
4-3	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
15-3	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
2-4	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
14-4	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
15-4	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
16-4	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
17-4	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199
22-4	GTGAAGGGGCAGTAGTAAT	199

Figura 39. Alineamiento de las 27 secuencias de *pol* 199pb en el programa Clustal Omega (CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment), disponible en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

Con lo anteriormente descrito se detectó que las variaciones en la T_m del amplicón eran resultado de la presencia de polimorfismos en la secuencia amplificada; los cuales modificaban la temperatura de disociación del producto. Como se puede observar en las secuencias, se tienen diversos sitios polimórficos; los cuales están representados con las bases degeneradas: M(A/C), R(A/G), W(A/T), S(C/G), Y(C/T) y K(G/T).

Con la finalidad de justificar teóricamente las diferencias en T_m , se realizó un modelaje de las curvas de disociación y T_m teórica esperada para las secuencias obtenidas (software uMelt (127), modelo Unified-SantaLucía (Natl. Acd. Sci., 1998) disponible en <https://www.dna.utah.edu/umelt/umelt.html>). Para el modelaje de las curvas de disociación, los sitios polimórficos representados con bases degeneradas fueron modificados por la primera opción de base de acuerdo al código señalado anteriormente. Esta primera colección se denominó “divergente 1”. Se realizó el mismo procedimiento

pero ahora los sitios polimórficos se sustituyeron por la segunda opción de base y se denominaron “divergente 2”. Los resultados de las curvas teóricas mostraron que las diferencias obtenidas si dependen de la secuencia y se dan a causa de los polimorfismos. Si bien todas correspondían al producto esperado (*pol* 199pb), las Tm experimentales y teóricas resultaron distintas, incluso distintas entre secuencias divergentes 1 y 2. En la siguiente tabla se detallan los resultados (Tabla 17).

SECUENCIA	ESTATUS	Tm TEÓRICA Divergente 1	Tm TEÓRICA Divergente 2	Tm EXPERIMENTAL
21-3	Recientes	85.20	84.80	79.08
22-3		85.40	85.40	79.48
23-3		85.70	85.40	79.48
24-3		85.10	85.10	78.66
13-1	Larga duración	85.50	85.70	79.49
14-1		85.10	85.10	79.64
18-1		85.00	86.00	79.64
23-1		84.70	85.70	79.49
26-1		84.70	86.10	79.53
29-1		85.30	86.00	79.29
30-1		84.60	85.00	79.04
1-2		85.00	85.00	80.24
2-2		85.50	85.50	80.14
3-2		85.20	86.20	80.04
4-2		84.70	86.00	79.64
10-2		85.50	86.20	79.89
11-2		85.50	85.50	81.77
21-2		85.20	85.50	79.94
3-3		85.20	85.50	79.58
4-3		84.90	86.30	79.23
15-3		85.50	85.60	79.22
2-4		85.20	86.20	79.88
14-4		85.20	85.60	79.83
15-4		84.30	85.60	79.93
16-4	84.80	86.10	79.33	
17-4	85.10	85.20	79.43	
22-4	85.70	85.60	79.23	

Tabla 17. Tm teóricas y experimentales de las secuencias divergentes: resultados de las curvas de disociación y Tm's de las secuencias de *pol* 199pb. En las secuencias denominadas “divergente 1” cada uno de los polimorfismos verdaderos encontrados en ellas fueron sustituidos por la primera opción de base nucleotídica correspondiente a cada base degenerada; lo anterior de acuerdo con el siguiente código: M(A/C), R(A/G), W(A/T), S(C/G), Y(C/T) y K(G/T). Mientras que en las secuencias “divergente 2” cada uno de los polimorfismos verdaderos encontrados en ellas fueron sustituidos por la segunda opción de base nucleotídica correspondiente a cada base degenerada; lo anterior de acuerdo con el siguiente código: M(A/C), R(A/G), W(A/T), S(C/G), Y(C/T) y K(G/T). En la columna 1 se muestra el número consecutivo de la muestra, en la siguiente el estatus de infección de la misma (recientes y de larga duración), la columna de

T_m teórica divergentes 1 y la siguiente columna T_m teórica divergentes 2 concentran los resultados de la disociación de cada secuencia llevada a cabo con el programa uMelt, finalmente en la columna de T_m experimental se presentan las T_m's resultantes en los ensayos de RT-qPCR. En negritas se resaltan los datos mínimos y máximos de cada columna de T_m's.

9.4.6 Ensayo HRM: a partir de RNA y DNA.

De manera posterior a los experimentos de qPCR y RT-qPCR, los datos de salida (archivos .eds) donde se detallan las lecturas de temperatura vs fluorescencia (equipo de PCR en tiempo real Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR 7500, Thermo Scientific); se convirtieron al formato .FLO (mediante un programa informático hecho en casa, para su ingreso, análisis y obtención del HRM score en el *software* DivMelt (disponible en <http://cran.r-project.org/web/packages/DivMelt/index.html>) (116). Los desarrolladores implementaron el *software* DivMelt como una librería dentro del programa estadístico R (<http://www.R-project.org/>) (128).

El *software* DivMelt presenta una interfaz gráfica para el análisis de los datos, a través de un menú. Los parámetros seleccionados para analizar los datos tanto de qPCR (DNA) como de RT-qPCR (RNA), se basaron en las recomendaciones de los desarrolladores del mismo (116). A continuación se describe brevemente la configuración inicialmente elegida: ángulo de T1 50°, ángulo de T2 30°, ventana de amplitud para T1 y T2 de 1°C, exclusión de picos anteriores o *shoulders* cuando estos superen el 10% del pico principal (correspondiente al amplicón de interés).

Los resultados obtenidos del DivMelt se visualizan en una gráfica de disociación del producto generada con el *software* en cuestión a partir de los datos de temperatura (eje x) vs fluorescencia (eje y). En las gráficas de salida se muestra el HRM score correspondiente, T1 y T2; así como la T_m. Las siguientes figuras resultaron del análisis HRM con los resultados del experimento de estandarización de qPCR (DNA) para amplificar *pol* 199 pb (figura 40).

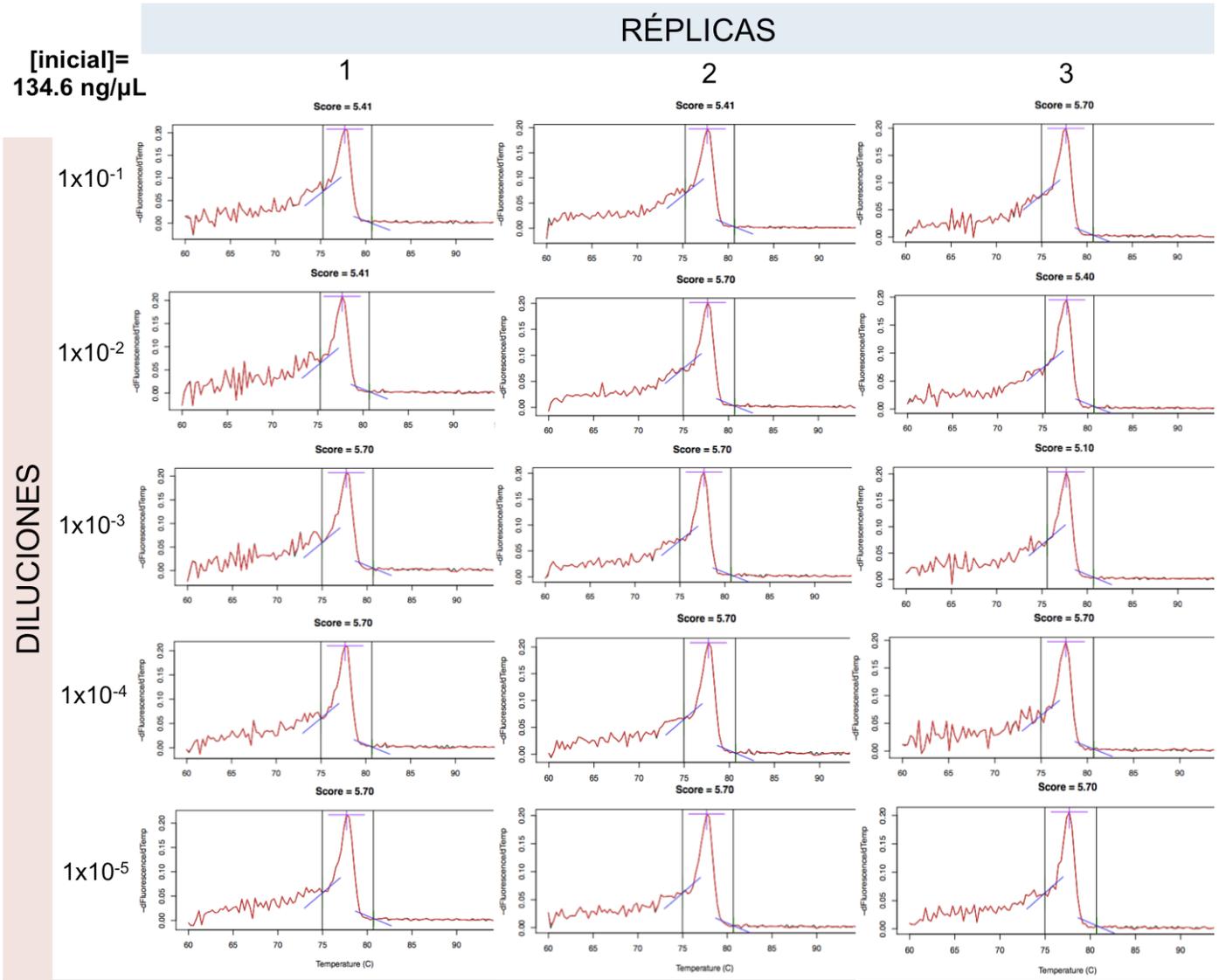


Figura 40. Resultados HRM de la estandarización de qPCR *pol* 199 pb. Se presentan las gráficas de salida del *software* DivMelt para cada una de las diluciones incluidas en la curva estándar. Las diluciones se muestran a la izquierda y van en orden de arriba abajo, la concentración inicial de DNA para la curva fue de 134.6ng/μL. En la parte superior de la figura se detallan las réplicas técnicas de cada dilución con su número correspondiente. Todas las muestras resultaron con una T_m de 77.68°C (denominadas *peak*, línea magenta). Así mismo, se pueden notar con líneas azules T1 y T2 para cada muestra, y el HRM score calculado por DivMelt; los cuales presentaron una variación mínima.

Se realizaron experimentos de qPCR con DNA obtenido a partir de muestras de plasma (estatus de infección desconocido), DBS artificiales generados en laboratorio con sueros

de estatus conocido, y con *pools* de producto de PCR del RT-qPCR automatizado mrt2000 RealTime System® de Abbott. Todas las muestras utilizadas fueron proporcionadas por la Clínica Especializada Condesa. El producto de mrt2000, al provenir de diferentes muestras se consideró como “infección de larga duración (artificial)” debido a la gran cantidad de cuasiespecies y diversidad genética que contenía. El panel de muestras analizadas constó de 44 muestras, de las cuales 10 eran infecciones recientes, 22 de estatus desconocido y 12 de larga duración.

Del procesamiento por qPCR, se obtuvo que el 38.6% de las muestras amplificaron *pol* de 199 pb. Los datos de la curva de disociación de estas se analizaron con el *software* DivMelt y se obtuvo su *HRM score*. El promedio de los *HRM scores* de las infecciones recientes fue de 4.65, mientras que el promedio para las desconocidas 4.8, y 6.25 para las de larga duración (tabla 18).

MUESTRA	HRM score	PROMEDIO
R1	-	4.65
R2	4.81	
R3	-	
R4	-	
R5	4.49	
R6	-	
R7	-	
R8	-	
R9	-	
R10	-	
D1	-	4.8
D2	4.49	
D3	-	
D4	-	
D5	-	
D6	-	
D7	-	
D8	-	
D9	-	
D10	-	
D11	5.1	
D12	-	

D13	-		
D14	-		
D15	-		
D16	-		
D17	-		
D18	-		
D19	-		
D20	-		
D21	-		
D22	-		
LD1	7.7		6.25
LD2	6.89		
LD3	6.61		
LD4	6.3		
LD5	6.59		
LD6	7.62		
LD7	5.5		
LD8	5.5		
LD9	5.5		
LD10	5.7		
LD11	5.7		
LD12	5.4		

Tabla 18. Resultados de HRM score obtenidos con el qPCR a partir de DNA. La tabla muestra el total de muestras: R (recientes), D (desconocidas) y LD (larga duración). Para aquellas que si amplificaron, se muestra el *HRM score* y en las que no se nota un signo de menos. En la última columna se puede observar el promedio de *HRM score* para cada grupo de muestras.

De acuerdo con el fundamento planteado para diferenciar infecciones recientes y no recientes por *HRM*, con el panel de DNA analizado se obtuvo que las infecciones recientes si tuvieron un *HRM score* menor al de las infecciones de larga duración (tabla 18). El *HRM score* obtenido para las muestras recientes corresponde con los publicados por otros autores para infecciones igualmente recientes (*HRM score* ≤ 5) (5,45,117,119,129). En las siguientes gráficas se ejemplifican los resultados de este panel y se puede observar el incremento en el ancho de la base de las curvas de disociación (figura 41).

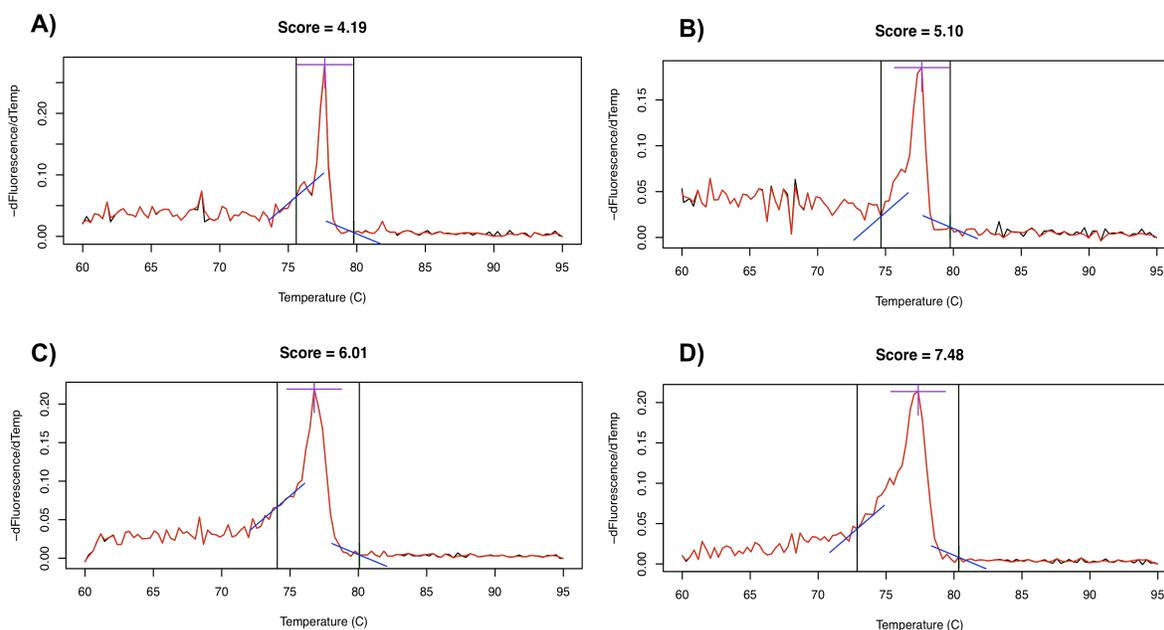


Figura 41. Gráficas de salida del análisis *HRM* de las muestras de DNA, con el *software* DivMelt. Se puede notar el incremento en el ancho de la base de la curva, desde el gráfico A (arriba izquierda) hasta el D (abajo derecha), así también el incremento en el *HRM score*. La curva A corresponde a una muestra de infección reciente por VIH (T_m 77.66°C), la B a una de estatus desconocido (T_m 77.67°C), y las C (T_m 76.77°C) y D (77.36°C) son de infecciones de larga duración. Como se puede notar en las T_m de cada curva, las diferencias entre ellas superan lo permitido teóricamente para especificidad de producto en qPCR.

Con el cambio de material biológico de DNA a RNA, tal como se mencionó en el apartado anterior, se procesaron las 102 muestras (provenientes del panel de la Clínica Especializada Condesa). Del total de muestras (por triplicado), el 99% amplificó el producto de interés (*pol* 199 pb). De estas, 98 pertenecían a infecciones de VIH de larga duración, 3 de infecciones recientes (≤ 1 año) y 1 de infección aguda (positiva para Ag de VIH y negativa a Ac, aproximadamente menos de 1 mes de infección).

El promedio de los *HRM scores* para las infecciones recientes a partir de RNA se calculó en 4.11, mientras que para las infecciones de larga duración, todos los *scores* resultaron >5 . De este panel de 102 muestras, como ya se mencionó antes se eligieron 27 productos para secuenciación; entre estos se incluyeron las 3 infecciones recientes, la infección aguda y 23 infecciones de larga duración. Para confirmar los resultados obtenidos con el HRM y para corroborar que la diversidad genética es mayor en infecciones de larga

duración con respecto de las recientes, se analizó la diversidad genética de las secuencias. Una vez obtenida la secuencia consenso de dichos productos, se generaron dos colecciones una de infecciones recientes (n=4) y una de larga duración (n=23). Con ellas se calculó la diversidad nucleotídica o “ π ” con el *software* DNA sequences polymorphism (disponible en <http://www.ub.edu/dnasp/>) (130); de acuerdo con lo representado en la tabla siguiente (tabla 19):

Muestras	n	S	S/L	Π	Π/L (π)
Recientes	4	17	0.0854	7.0227	0.0353
Larga duración	23	42	0.2111	8.8754	0.0446

Tabla 19. Diversidad nucleotídica/genética calculada con base en la secuenciación. Donde n= número de muestras o secuencias en la colección, S= número de sitios polimórficos, L= longitud del fragmento amplificado en pb (199 para este caso), Π = diversidad genética y π = diversidad nucleotídica en el fragmento amplificado.

Con los resultados obtenidos se concluye que, a pesar del tamaño de muestra para cada colección, la diversidad nucleotídica presente en las infecciones recientes (0.0353) es menor con respecto de la diversidad en las infecciones de larga duración (0.0446). Lo anterior demuestra la validez de los resultados obtenidos con el análisis *HRM*, al comparar lo obtenido con el estándar de oro que es la secuenciación.

Se realizó también una evaluación para determinar si el material genético inicial afecta los resultados del *HRM*; para ello, se hizo una comparación de las muestras recientes con base en su *HRM score*; usando ambos ácidos nucleicos para cada una: DNA y RNA. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los *HRM scores* obtenidos con DNA y RNA. Los resultados se detallan en la siguiente tabla (tabla 20).

	PROMEDIO DE HRM SCORE POR MUESTRA	
MUESTRA	DNA	RNA
1465277	3.88	4.37
1466297	4.05	4.40
1466294	4.51	4.51
1466111	4.00	4.20
PROMEDIO	4.11	4.37
DESV.EST.	0.28	0.13

Tabla 20. Promedio de los *HRM scores* obtenidos de las muestras recientes, tanto con DNA como con RNA. Se puede notar que los *HRM scores* obtenidos se mantienen por debajo de 5, sin importar el material genético utilizado. Al realizar una prueba t de student para comparar ambos grupos, se obtuvo una **p=0.14**. Al tomar en consideración una significancia estadística $p < 0.05$, se concluye que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los *HRM scores* obtenidos para las muestras recientes a partir de DNA y RNA.

Adicionalmente a los resultados iniciales obtenidos con la configuración del *software* DivMelt sugerida por los desarrolladores, se llevaron a cabo modificaciones en los ángulos para determinar T1 y T2. Lo anterior con la finalidad de mejorar la medición del ancho de la base de la curva. Las siguientes figuras muestran las gráficas de disociación y el análisis *HRM* de las 4 muestras recientes con DNA y RNA (sus correspondientes replicados técnicos), y se detallan los parámetros utilizados para cada una. Los parámetros para configurar el análisis *HRM* se modificaron individualmente (figuras 41-60), al analizar cada curva desde un ángulo de 10° hasta 90° para T1, con incrementos de 5° en 5°. Lo mismo se realizó después para T2. De manera general, para todas las muestras a partir de DNA se obtuvo una mejor medición de la base de la curva con un ángulo de T1= 50° y uno de T2= 75° (figuras 42-52). Para el caso de las muestras de RNA, los parámetros fueron distintos para cada muestra (figuras 53-61). Lo detallado se puede observar en las figuras correspondientes.

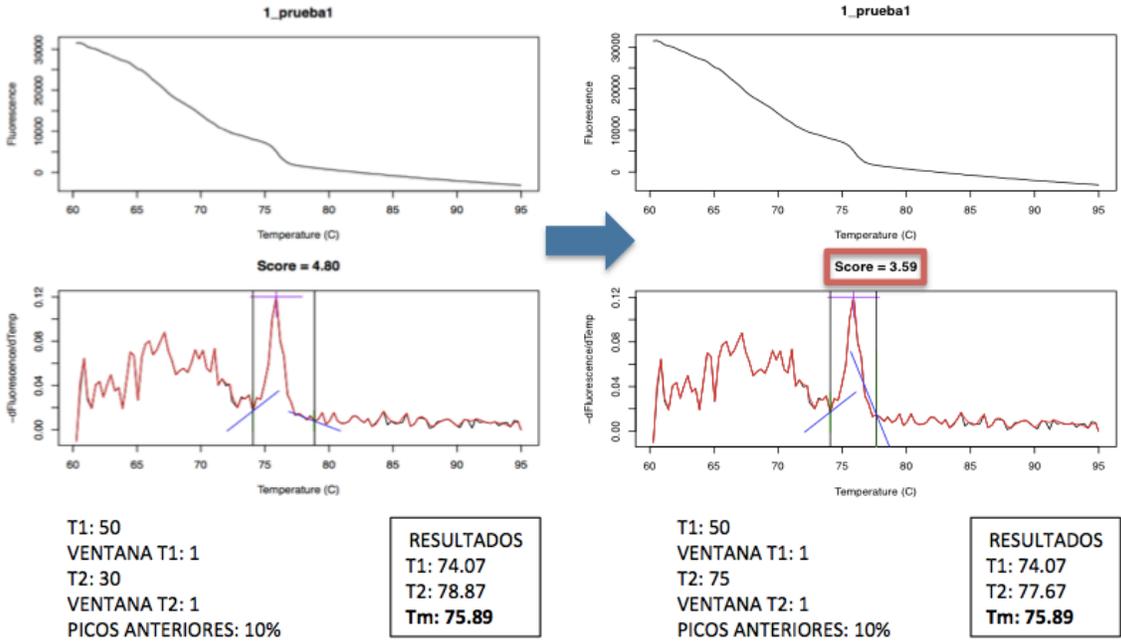


Figura 42. Muestra de DNA reciente 1465277, réplica 1.

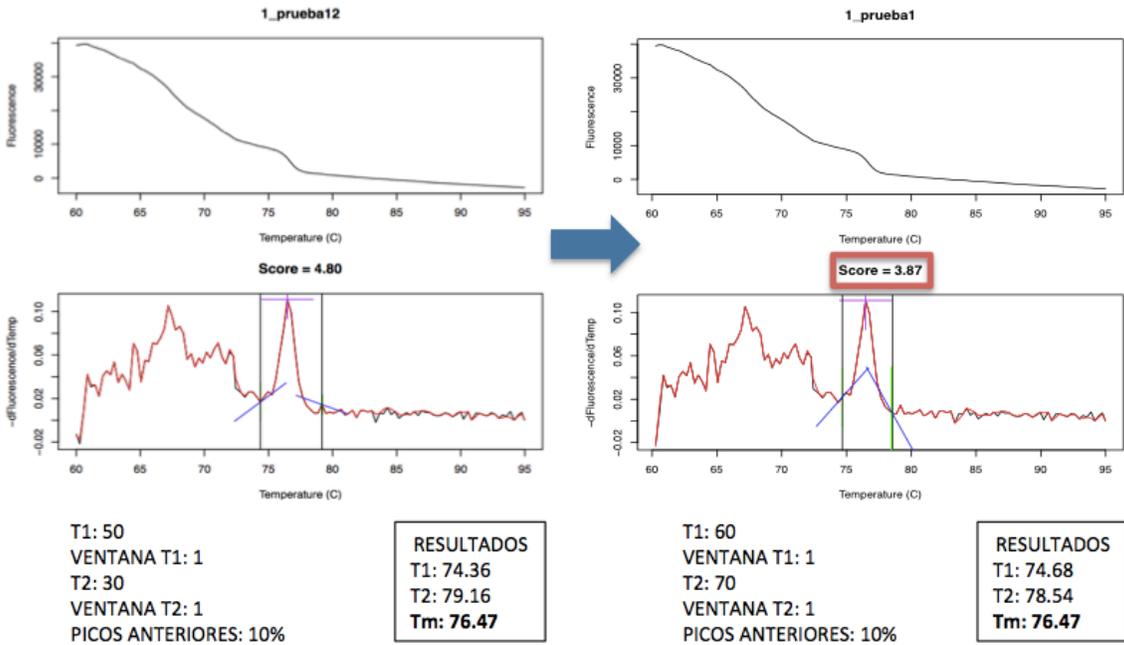


Figura 43. Muestra de DNA reciente 1465277, réplica 2.

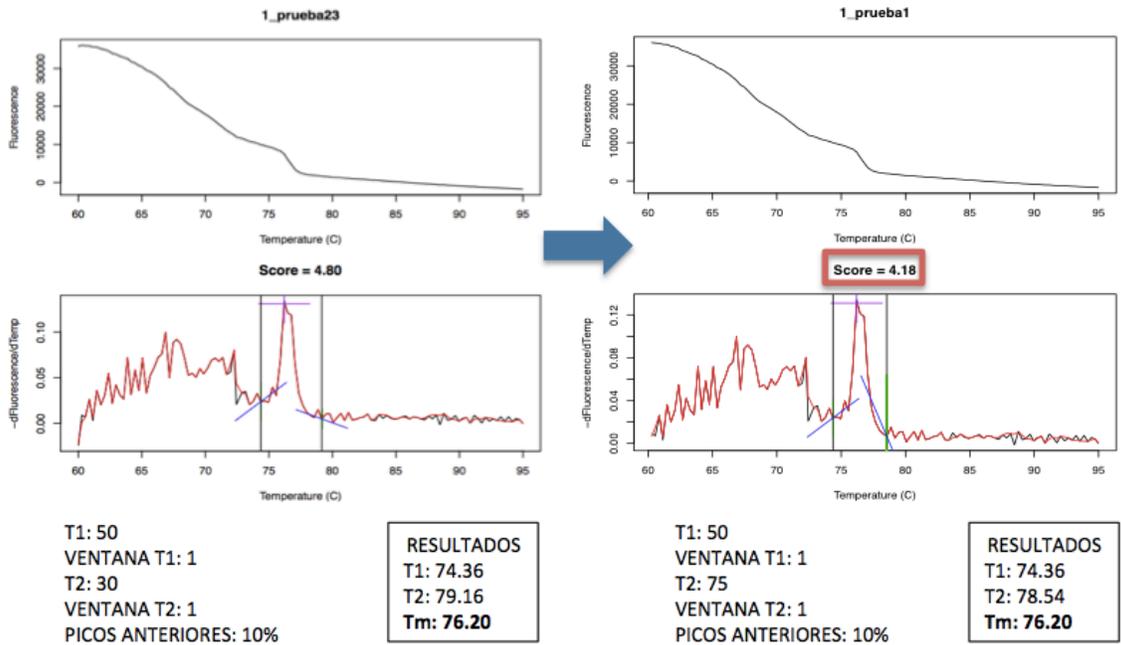


Figura 44. Muestra de DNA reciente 1465277, réplica 3.

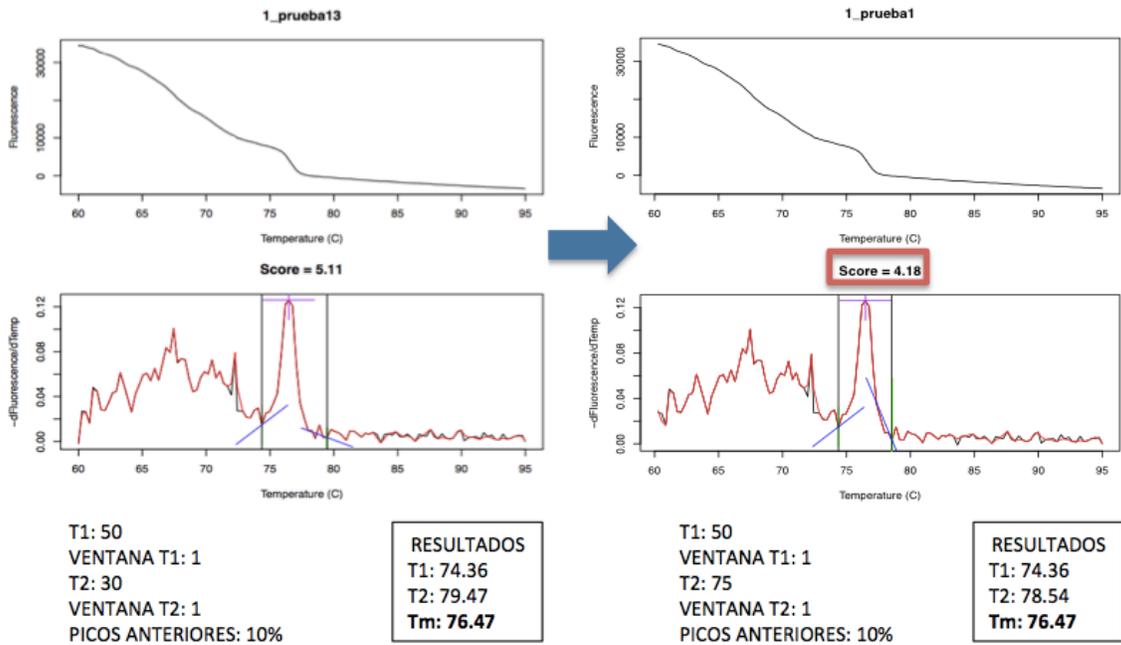


Figura 45. Muestra de DNA reciente 1466297, réplica 2.

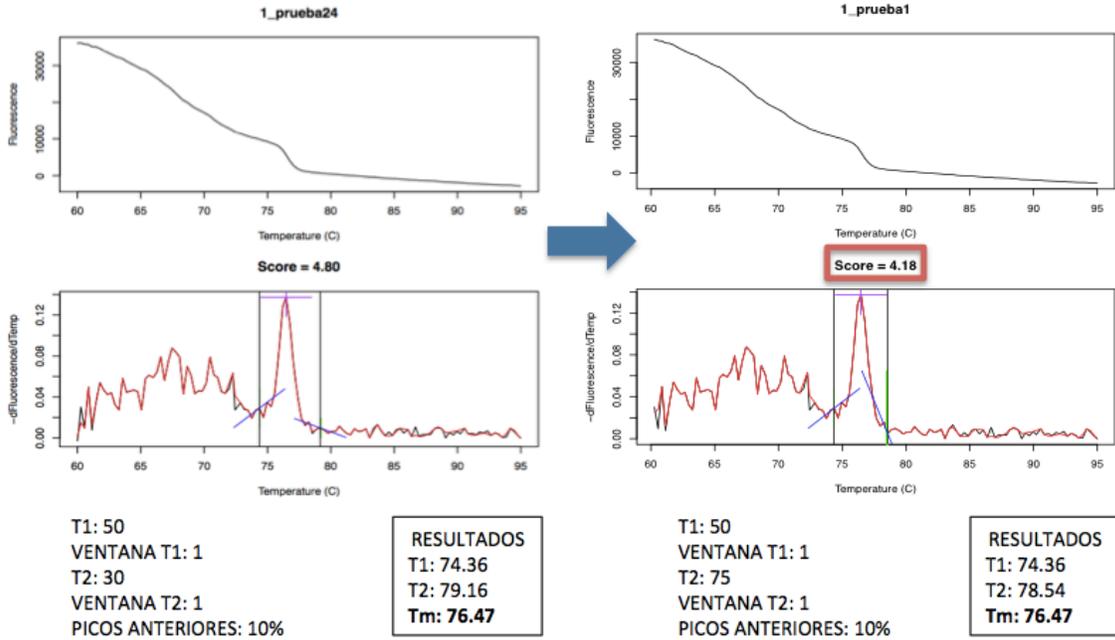


Figura 46. Muestra de DNA reciente 1466297, réplica 3.

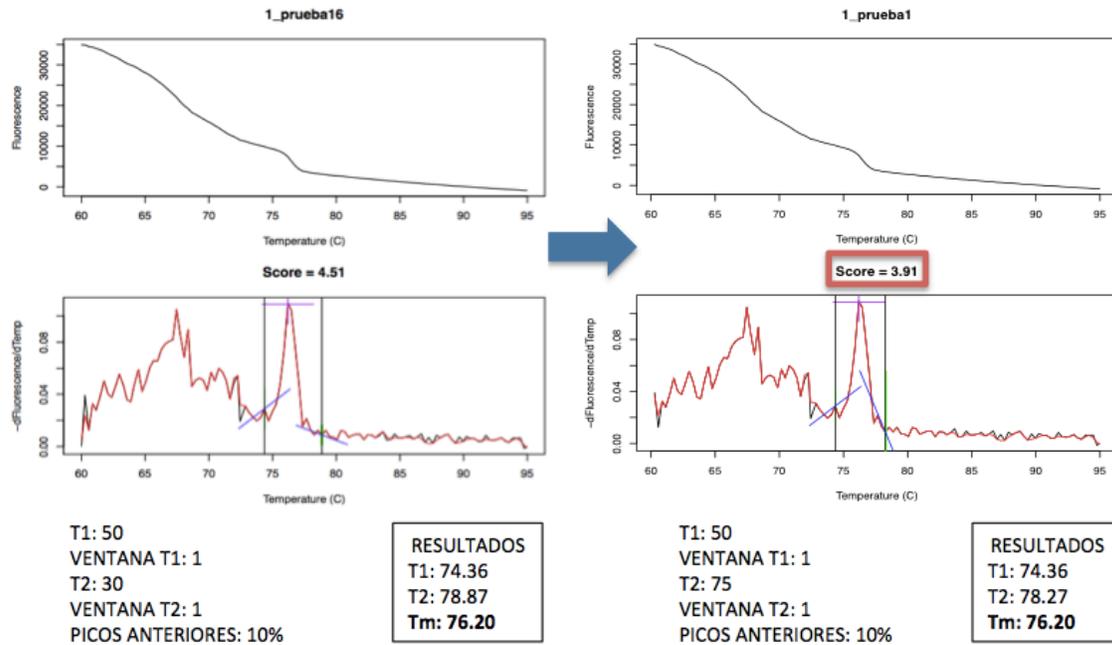


Figura 47. Muestra de DNA reciente 1466297, réplica 5.

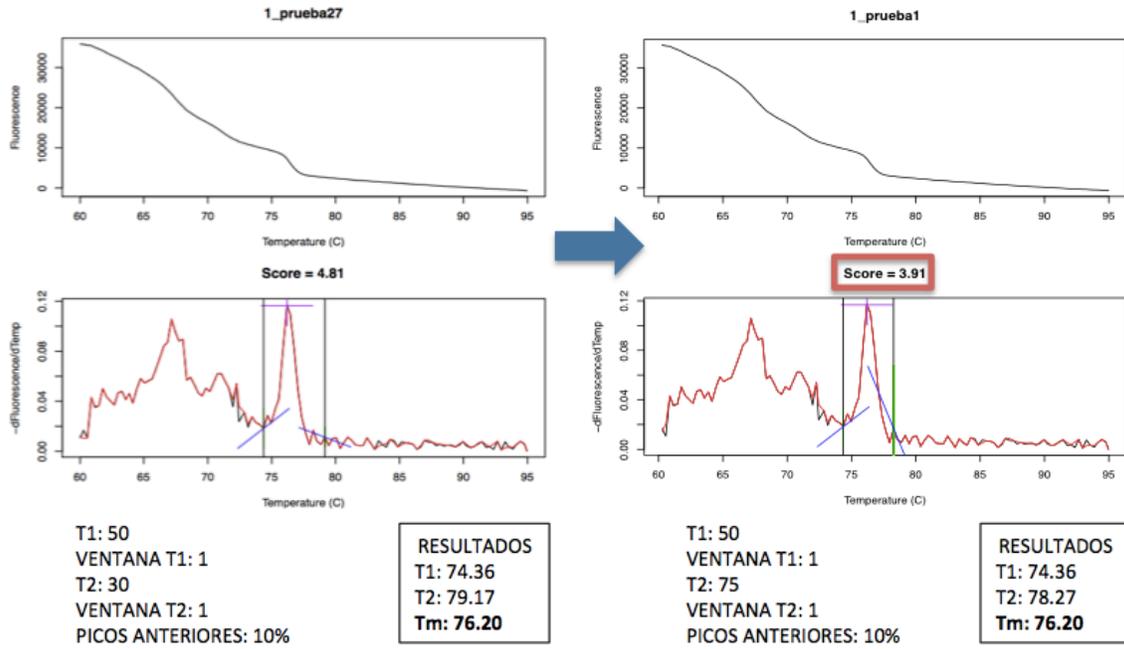


Figura 48. Muestra de DNA reciente 1466297, réplica 6.

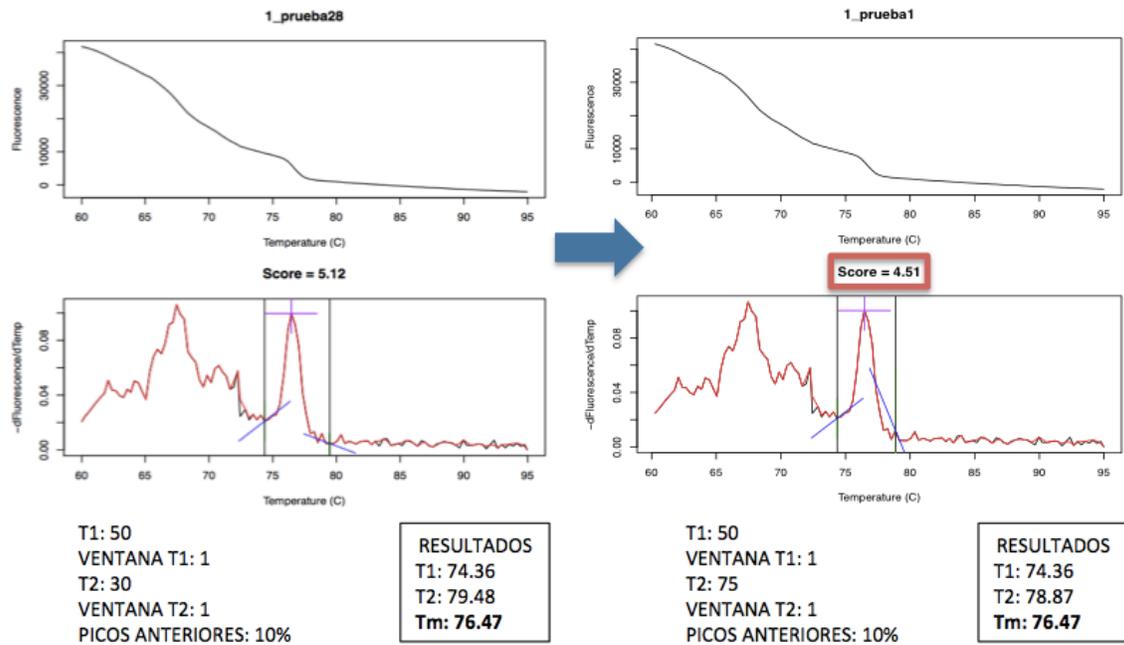


Figura 49. Muestra de DNA reciente 1466294, réplica 6.

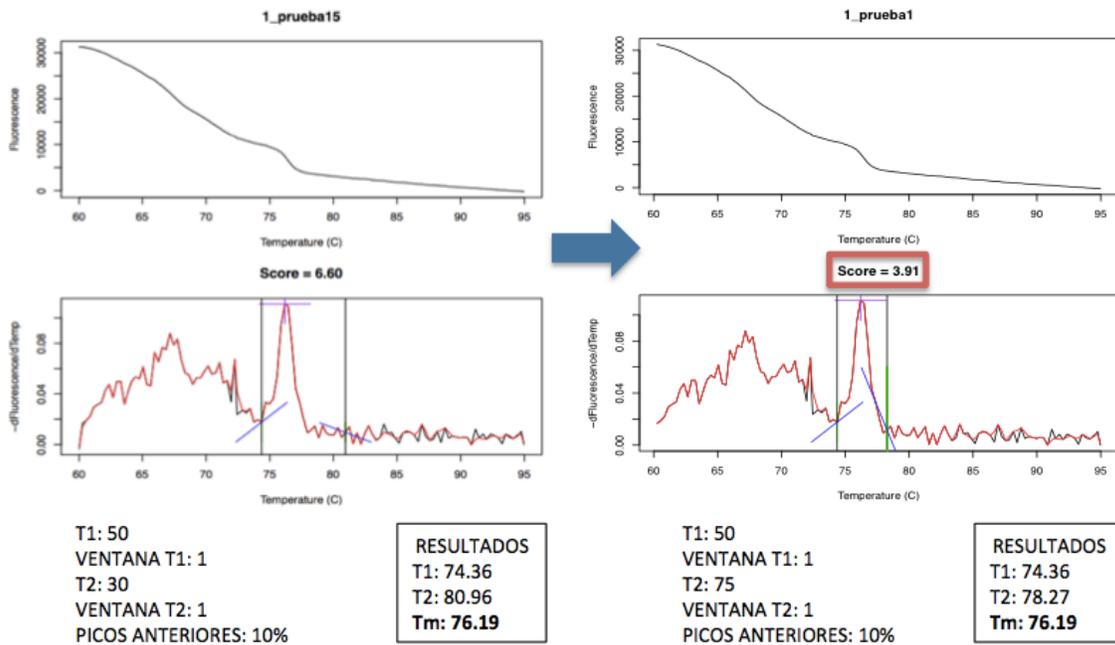


Figura 50. Muestra de DNA reciente 1466111, réplica 2.

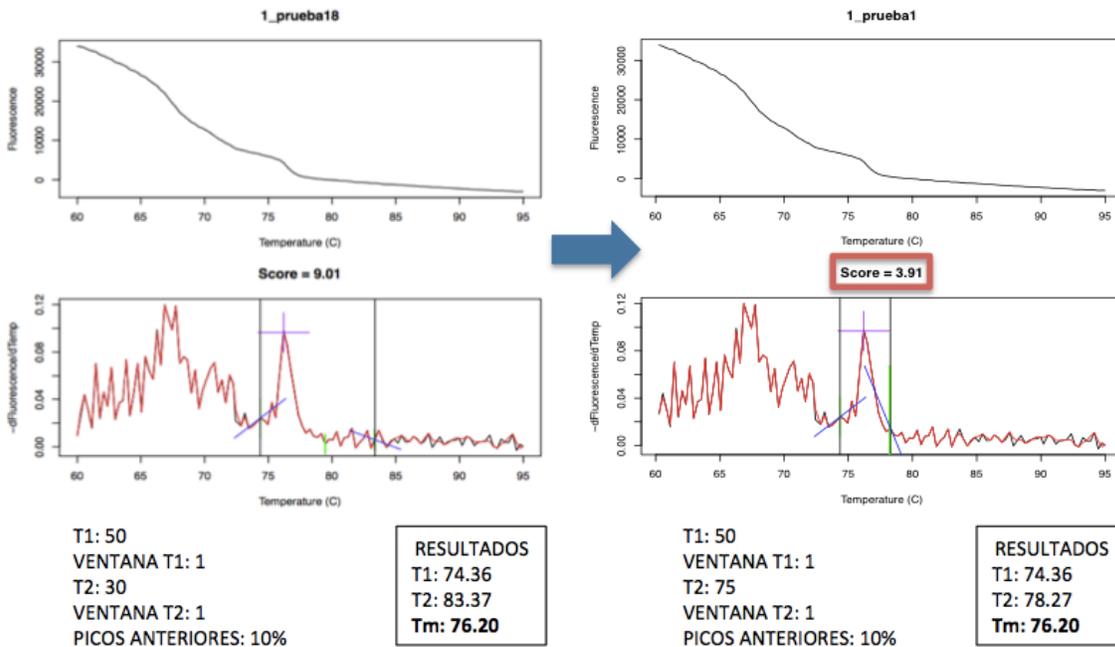


Figura 51. Muestra de DNA reciente 1466111, réplica 5.

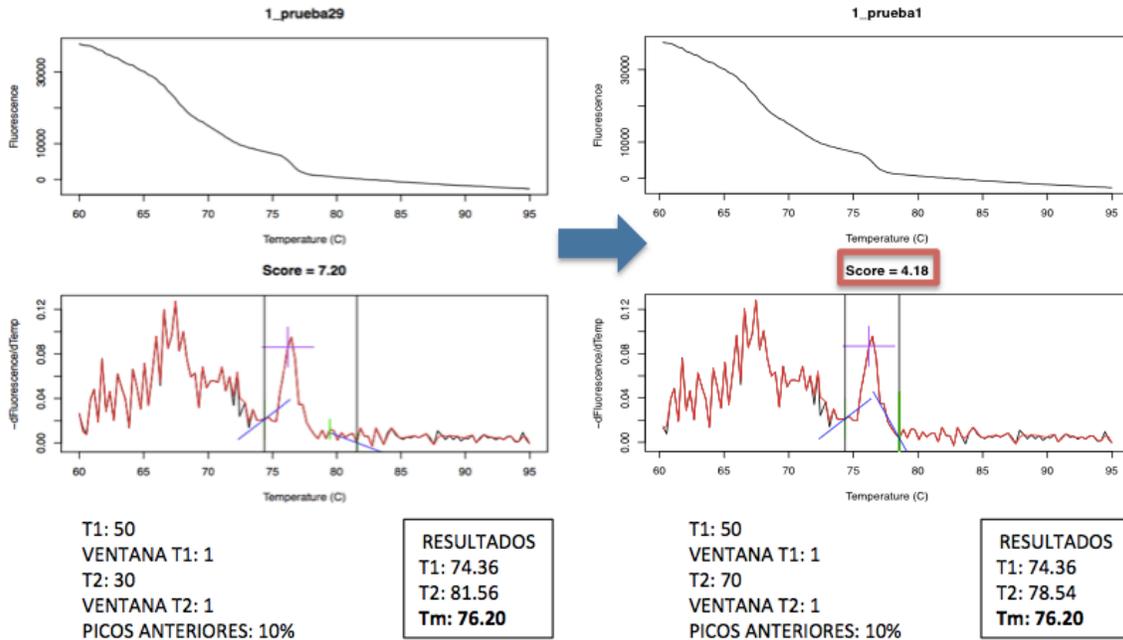


Figura 52. Muestra de DNA reciente 1466111, réplica 6.

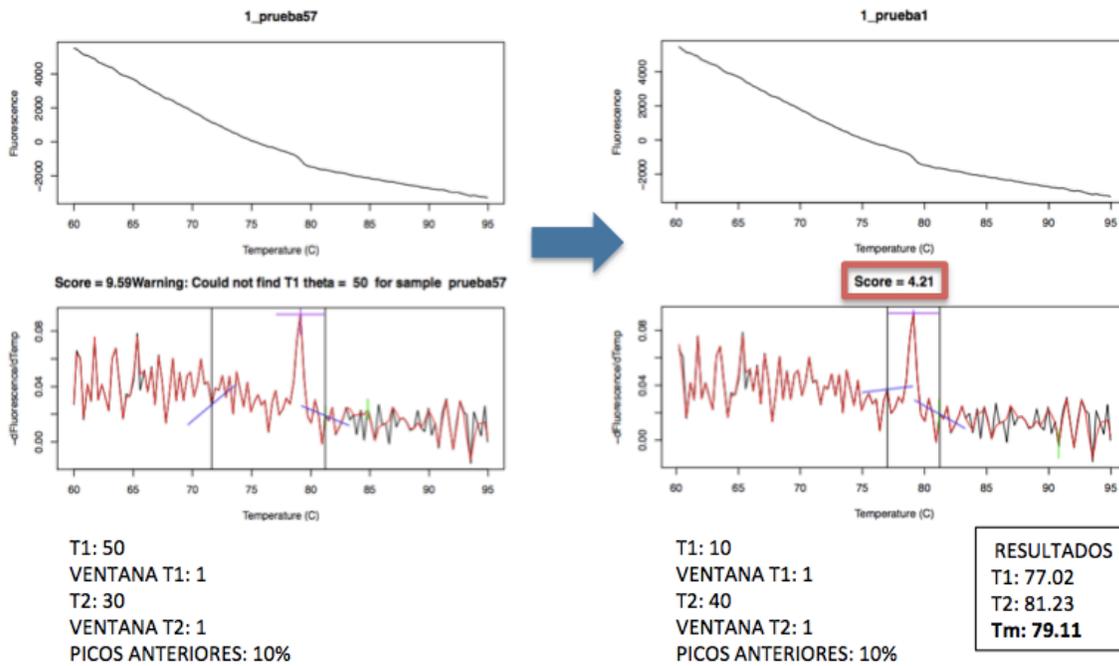


Figura 53. Muestra de RNA reciente 1465277, réplica 2.

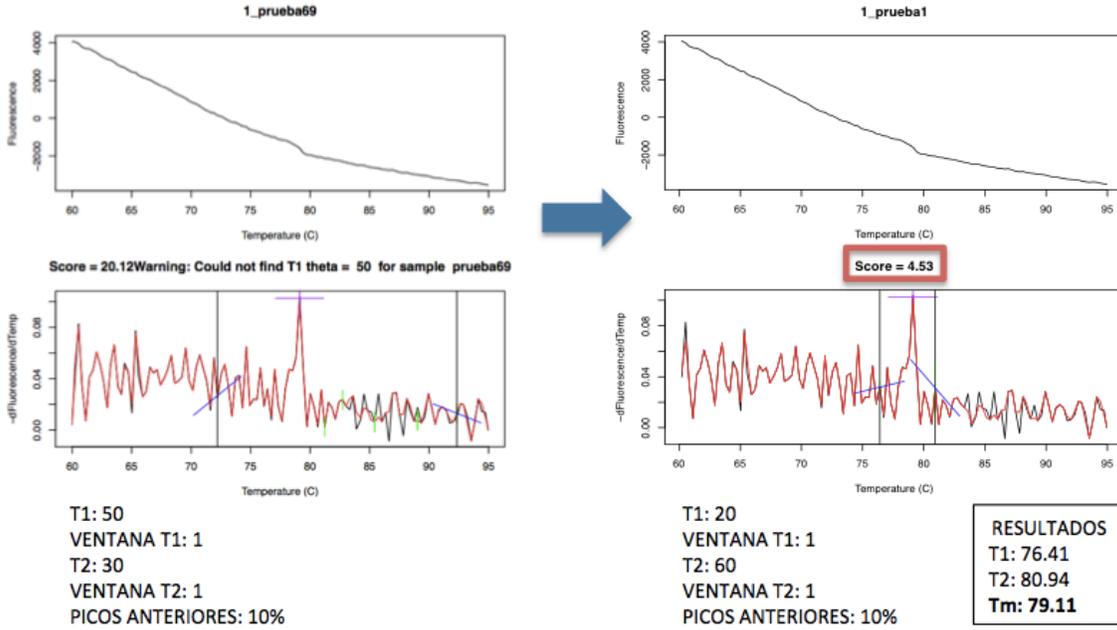


Figura 54. Muestra de RNA reciente 1465277, réplica 3.

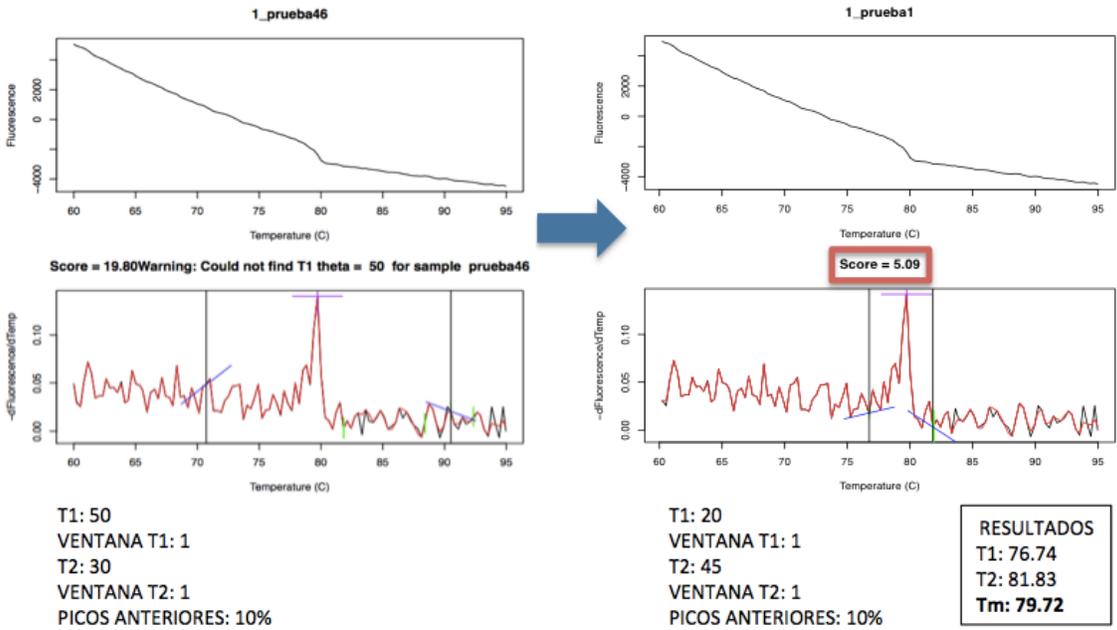


Figura 55. Muestra de RNA reciente 1466297, réplica 1.

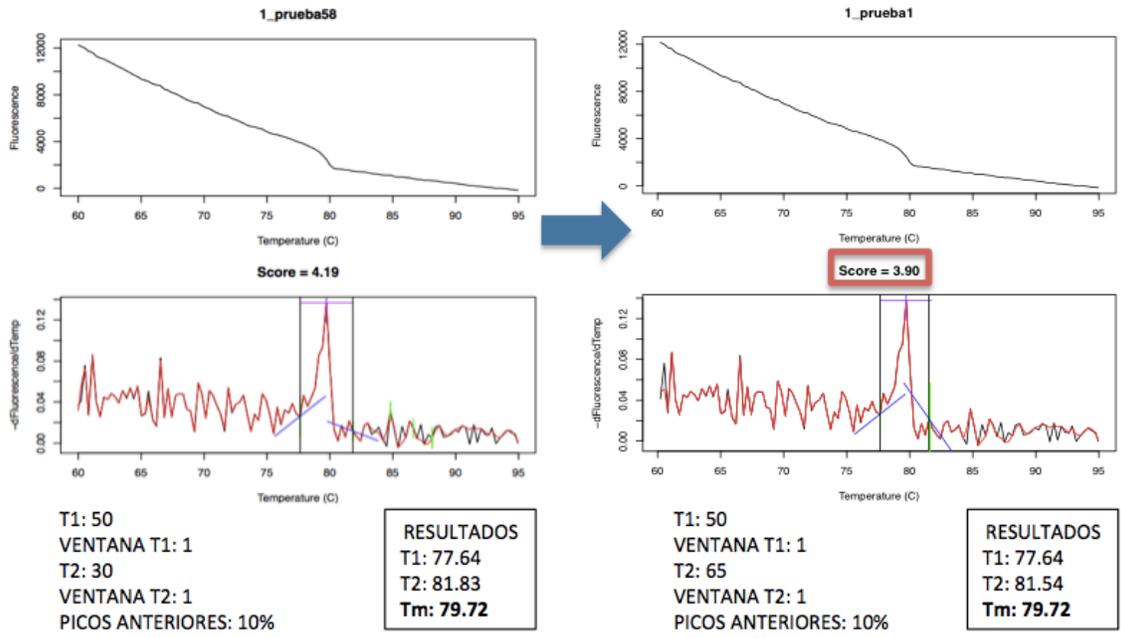


Figura 56. Muestra de RNA reciente 1466297, réplica 2.

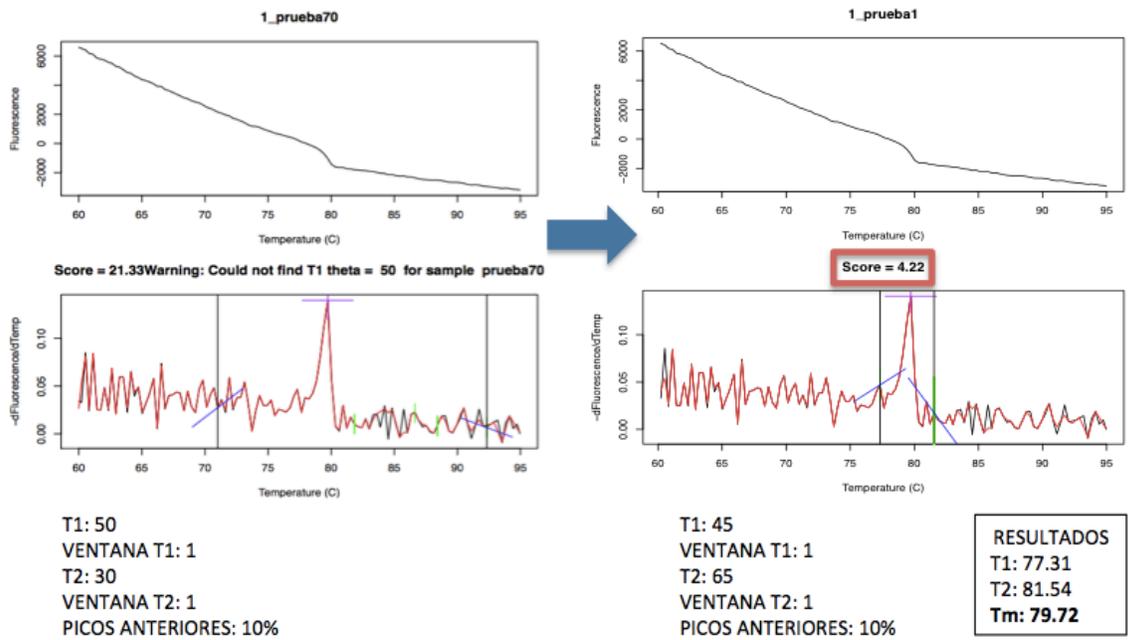


Figura 57. Muestra de RNA reciente 1466297, réplica 3.

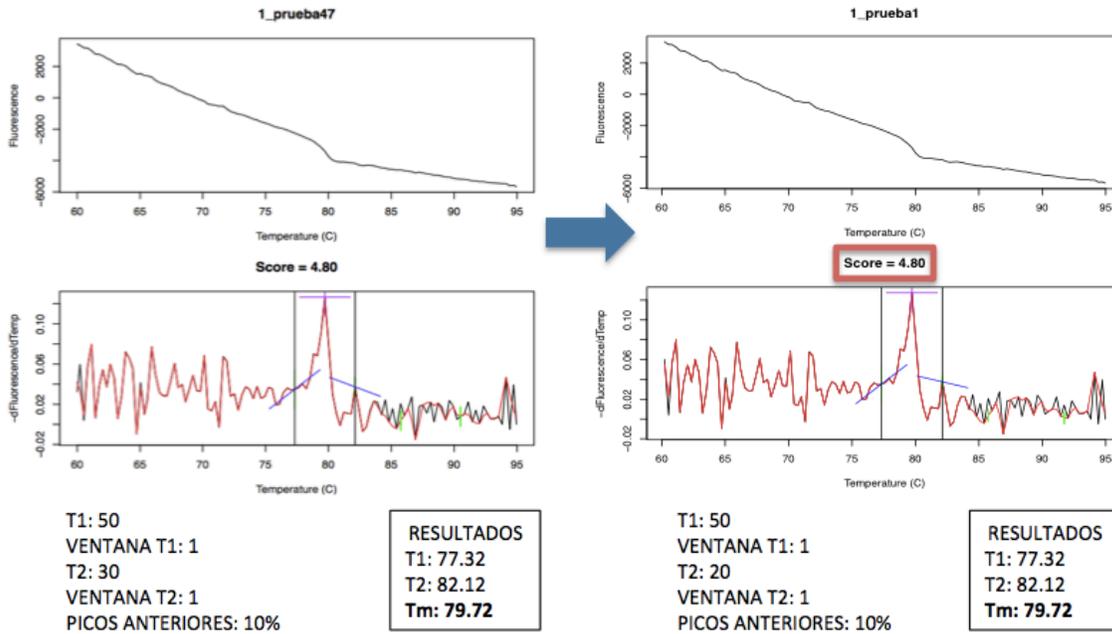


Figura 58. Muestra de RNA reciente 1466294, réplica 1.

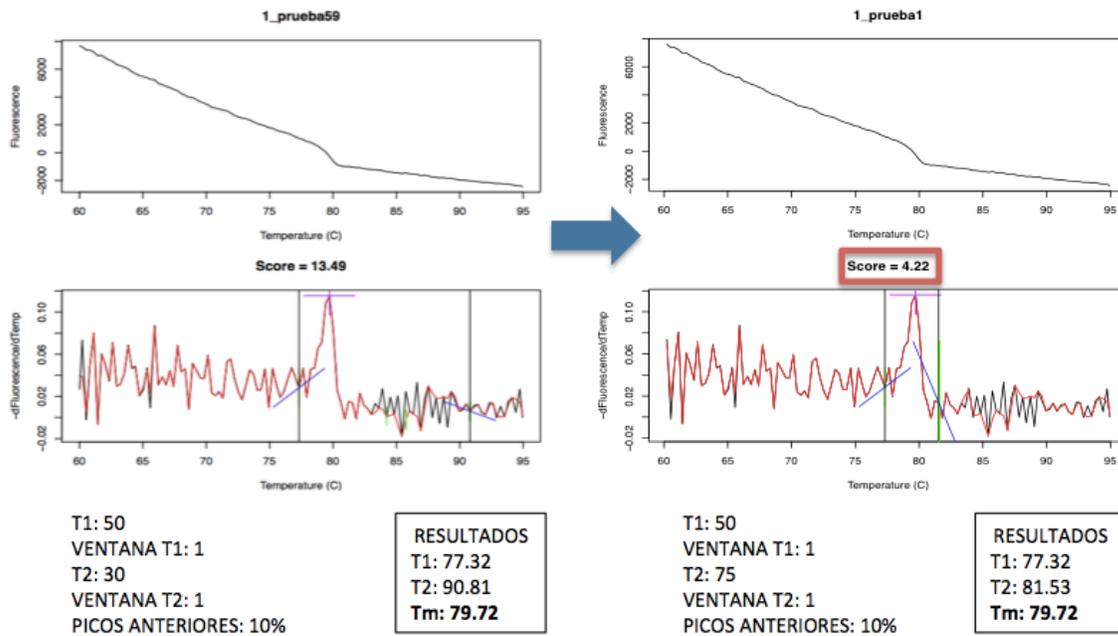


Figura 59. Muestra de RNA reciente 1466294, réplica 2.

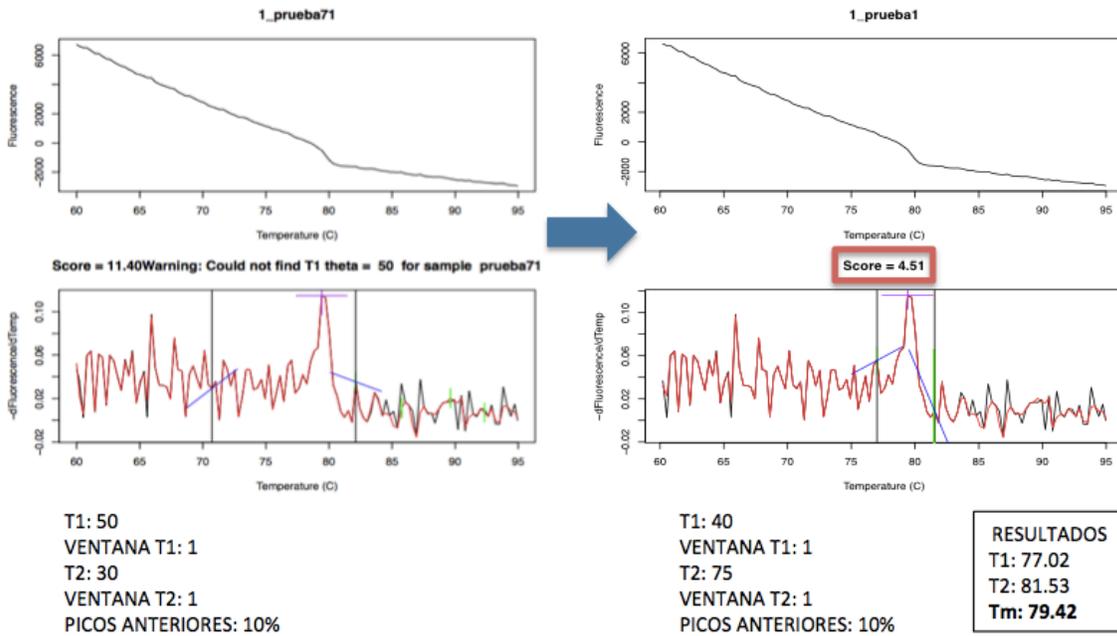


Figura 60. Muestra de RNA reciente 1466294, réplica 3.

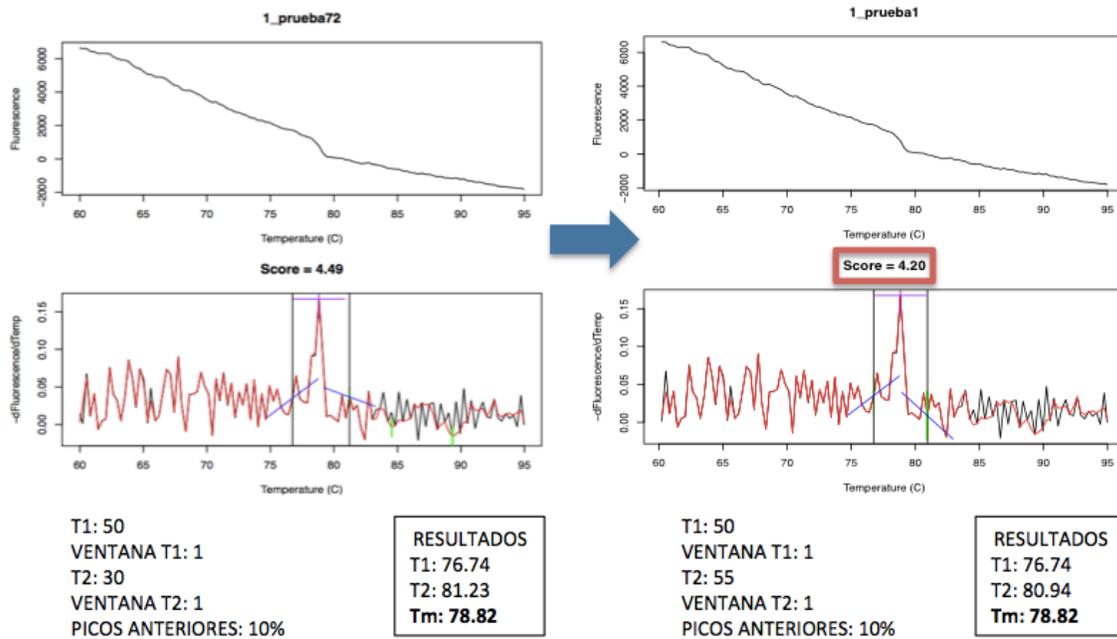


Figura 61. Muestra de RNA reciente 1466111, réplica 3.

A pesar de que los desarrolladores del *software* señalan como primera opción ángulo T1=50° y T2=30°, no invalidan los resultados obtenidos con diferentes T; si se cumple el

propósito de tomar el mejor punto de inicio y final de la curva de disociación.

En este trabajo sólo se contó con 4 muestras recientes, por lo que, aunque los resultados nos permiten hipotetizar que los *HRM scores* menores de 5 obtenidos con infecciones recientes corresponden con menor diversidad genética; estos deben ser interpretados con cautela ya que se requiere de una validación de los mismos con una n mayor.

10. DISCUSIÓN

- Determinación de infecciones recientes por VIH.

El presente estudio sigue las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), al tener en cuenta el uso de un algoritmo de pruebas para infecciones recientes por VIH (*RITA*) y corregir los datos por FRR (43) Ya que el FRR se refiere a la probabilidad específica de que un individuo que esta infectado por más tiempo que el considerado como “reciente” (de acuerdo a lo establecido por la prueba diagnóstica utilizada, BED 153 días), produzca un resultado reciente (131); la determinación específica de este error en el contexto de la población de estudio analizada y del subtipo de VIH es de suma importancia. En este trabajo se utilizó un FRR calculado previamente con muestras de DBS y suero de HSH VIH positivos de México; es decir que se obtuvo de una población altamente similar a la aquí analizada. A pesar de que existen publicaciones que detallan el uso de diversos parámetros para modelar y calcular el FRR, tales como la carga viral; así como algunas condiciones a excluir en los ensayos BED para el cálculo del FRR como el uso de TARV y el ser control elite, nosotros no contabamos con información tan detallada para incluirla y tomarla en cuenta para la estimación del FRR. El cálculo se realizó de manera simple, al únicamente contrastar los datos de infección “reciente” obtenidos del ensayo BED con el expediente clínico de la persona, y con ello asumir un error en la clasificación (131,132). Una publicación de Hallett T. en 2011 mostró que de 39 artículos, ninguno corregía sus datos de infecciones recientes con un FRR específico para su población, ni por otro dato utilizado para otras poblaciones o regiones; en consecuencia, la estimación de la incidencia puede contener errores (133). Lo anterior destaca la validez del trabajo actual,

en el que el cálculo de la incidencia estimada se realizó y corrigió con un FRR calculado exclusivamente en HSH en México (123). Actualmente se han concebido mejoras en la estimación del FRR a utilizar en los algoritmos tipo RITA. Si bien nosotros basamos nuestros resultados en un FRR calculado de manera más simple, existe la posibilidad de estimar un nuevo FRR siguiendo las recomendaciones más recientes y reanalizar nuestros datos (132). La corrección con el FRR aquí realizada, representa una mejora en los datos de incidencia presentados; en comparación con asumir y utilizar un FRR=0%, que de acuerdo a artículos publicados sobreestimaría de manera significativa los resultados (131). La estimación publicada sobre la prevalencia e incidencia nacional de VIH no describe lo que sucede a nivel regional o de ciudad, y menos en una población vulnerable como los HSH. Existen publicaciones que calculan la incidencia del VIH en la población general e incluyen a la población HSH. No hay datos de incidencia enfocados exclusivamente en la población de HSH por región geográfica; aunque hay estimaciones de la incidencia en pequeñas comunidades de HSH (14,15,133–136). Los resultados muestran los contrastes entre la prevalencia, las infecciones recientes y la incidencia estimada a nivel regional, lo que indica que la dinámica poblacional de la epidemia de VIH entre los HSH difiere entre regiones en el mismo país. Esta dinámica de transmisión podría estar bajo la influencia de múltiples variables, a diferentes niveles con diferente impacto (figura 25).

- Factores de riesgo asociados a la transmisión de VIH entre HSH que acuden a sitios de encuentro: análisis regional.

No todas las etapas en el continuo de la atención al VIH son posibles de estimar con la información de una encuesta, debido a que hay un alto porcentaje de personas que desconocen su diagnóstico y no pueden ser incluidas directamente en las etapas sucesivas. Además, factores como la mortalidad por VIH medida como parte de la vigilancia tienen un papel importante en la prevalencia y la incidencia (70,110). La alta mortalidad puede disminuir la acumulación de casos y, por lo tanto, dar lugar a una baja prevalencia. En contraparte, cuando la mortalidad es baja la prevalencia aumenta. Como consecuencia tardía de esto, si la mortalidad es alta y la prevalencia es baja, la incidencia

podría aumentar, especialmente si el diagnóstico es alto. Existen escenarios específicos para cada región, como aquellos donde el mayor número de casos tiende a prevalecer frente a la baja mortalidad, como en Occidente, que tiene una mortalidad más baja que la nacional. Sin embargo, en otras regiones con alta mortalidad, la prevalencia y el porcentaje de infecciones recientes son bajos, un ejemplo de esto es la región Sur. Como es posible notar, la mortalidad es una variable agrupada que afecta directamente la dinámica de la epidemia del VIH. Para los efectos del presente trabajo, un factor limitante para considerar la mortalidad por VIH es que los datos presentados se estimaron en la población general y pueden no explicar completamente los hallazgos en HSH para cada región y su disparidad (110).

Otro factor relevante es el hecho de tener conocidos con VIH/Sida, lo que también parece influir en la búsqueda de diagnósticos en individuos y su acercamiento a los servicios de salud, con consecuencias para las etapas sucesivas (LTC, RiC, TARV y supresión viral). Por ejemplo, la CDMX es la región con el porcentaje más alto de personas con conocidos con VIH/Sida (61.7%) y también presenta el porcentaje más alto de diagnóstico (41.2%) (Ver tablas 7-9). Esto ilustra la relación entre el conocimiento de la infección o enfermedad dada por aquellos conocidos por el VIH/Sida y la búsqueda de un diagnóstico. El mismo factor también puede estar relacionado con el estigma y la discriminación, porque en algunas regiones el reporte de conocidos con VIH/Sida es bajo (posiblemente debido al estigma y la discriminación), y precisamente esas regiones son las que presentan datos más altos de infecciones recientes. Este es el caso de la región Occidente, en la que solo el 49.7% de los HSH encuestados refirieron conocer a personas con VIH/Sida; y su porcentaje de infección reciente es superior al nacional (consulte las tablas 8 y 9). En nuestros resultados, la variable conocidos con VIH/Sida mostró diferencias entre las dos regiones más dispares: Occidente y CDMX, esta variable debe estudiarse más a fondo.

En este sentido, los resultados publicados por Bautista y colaboradores (15) el estigma y la discriminación social en Occidente alcanzaron el 50,9% de los encuestados; siendo esto más notable entre los colegas de la escuela, los policías, los amigos y la familia. Este

porcentaje de estigma y discriminación podría impactar en múltiples factores asociados con la incidencia del VIH, como el acceso y la realización de pruebas de diagnóstico. Esto daría como resultado un ingreso tardío al continuo de atención del VIH, y podrían aumentar la transmisión del virus; por lo tanto, promover el aumento de nuevas infecciones por VIH. De acuerdo con las referencias de los participantes, la discriminación es percibida incluso por parte de los profesionales de la salud y los servidores públicos, como consecuencia, la cascada de atención del VIH/Sida podría truncarse y causar diagnósticos y tratamientos tardíos; esto también podría afectar la prevalencia e incidencia del VIH (15,66).

La cobertura de TARV es una variable que podría afectar la prevalencia y la incidencia del VIH porque está altamente relacionada con la transmisión del virus. La alta cobertura de TARV, podría causar una carga viral indetectable y como consecuencia disminuir el número de infecciones recientes. Como ejemplo, en el Noreste, la prevalencia y la incidencia están por debajo de los datos nacionales y esta región tiene una alta cobertura de TARV (90%), por lo que la transmisión podría estar disminuyendo y por lo tanto, la incidencia. Si esta dinámica es constante, también la prevalencia podría disminuir, como se puede observar en esta misma región (consulte la tabla 9). La alta cobertura de TARV puede generar diferentes escenarios; a nivel individual, las personas con mejor estado de salud general continúan con su vida normal, incluidas las conductas de alto riesgo y aumentan las posibilidades de transmisión del virus debido a la cantidad y el tipo de contactos sexuales. Esto puede desencadenar un aumento en nuevas infecciones, como en el caso del Occidente (consulte la tabla 9). Todas las ideas anteriores se presentan asumiendo una buena adherencia al TARV. Sin embargo, esta medida podría sobreestimarse debido a que en la mayoría de los países se basa en el autoinforme del paciente (14,15,66,67,96).

Las variables agrupadas (o regionales) tienen diferentes efectos y algunos de ellos pueden interactuar como una cadena de eventos en la misma dinámica, y las consecuencias de eso son diferentes. La alta mortalidad podría ser una consecuencia de una cobertura de

TARV baja, y por lo tanto, la supervivencia disminuye. Por ejemplo, en el Sur la prevalencia del VIH y el porcentaje de infecciones recientes son casi iguales y la supervivencia es mínima. Esta relación se puede explicar con la siguiente expresión: Prevalencia = (Incidencia) (Duración de la enfermedad o supervivencia); esto incluso cuando es una región con un alto porcentaje de diagnóstico (tres puntos porcentuales por arriba de los datos nacionales).

En relación con los objetivos 90 90 90 de ONUSIDA para 2020, diagnóstico, cobertura y supresión viral; el presente trabajo explora dos de estos objetivos: el diagnóstico y la cobertura de TARV (137,138) Detectamos regiones con bajo diagnóstico y baja cobertura de TARV, por lo que el resultado es un aumento de infecciones recientes y, por lo tanto, una alta incidencia de VIH, como la región Centro. Del mismo modo, con un bajo porcentaje de diagnóstico, una deficiente cobertura de TARV y alta mortalidad, la prevalencia disminuye pero las infecciones recientes aumentan, como en la región del Noroeste.

Además del porcentaje de diagnóstico, la cobertura de TARV y la mortalidad, los comportamientos sexuales pueden determinar diferentes dinámicas de transmisión del VIH o modificar las existentes. En el análisis de los comportamientos sexuales por región, las personas diagnosticadas con VIH informaron comportamientos de mayor riesgo que las personas no diagnosticadas; posiblemente, esto podría condicionar un aumento en la transmisión viral. Por ejemplo, en la región Sur, que tiene una alta prevalencia incluso con la mortalidad más alta para todas las regiones; también presenta un mayor porcentaje de personas diagnosticadas con dos o más parejas sexuales en el último mes (44.4%) en comparación con aquellas personas no diagnosticadas con dos o más parejas sexuales en el último mes (34.2%). En el Noroeste, del total de trabajadores sexuales el 11.1% fueron diagnosticadas con VIH, mientras que el 5.3% de ellos no fue diagnosticado. Esta región presenta un alto porcentaje de infecciones recientes, lo cual podría ser consecuencia de este comportamiento sexual. Estos resultados son similares al menos para otras cuatro regiones, las personas con diagnósticos de VIH informaron comportamientos sexuales de

mayor riesgo (datos no mostrados).

De acuerdo con los hallazgos de este trabajo, el efecto de las variables agrupadas en las regiones determina diferentes escenarios de transmisión del VIH y, por lo tanto, resalta las diferentes dinámicas de la epidemia de VIH dentro del mismo país (Figura 25). Si bien, México en general, está clasificado como un país con una epidemia de VIH concentrada en grupos con comportamientos de riesgo, se ha encontrado que las variables analizadas a nivel individual y de población participan en esta dinámica con diferente impacto en cada región; lo que lleva a una epidemia con dinámica de transmisión del VIH específica en cada región analizada.

- *HRM* como ensayo molecular para disminuir el error de las pruebas serológicas para infecciones recientes.

En este estudio planteamos el ensayo HRM como una técnica para mejorar la especificidad del algoritmo RITA que generamos. En nuestro algoritmo incluimos información clínica y los resultados de una prueba serológica para infecciones recientes y la pretensión era la de dilucidar el estatus de la infección con los resultados del HRM. Cousins y colaboradores publican que evaluaron con HRM dos variables que normalmente suelen confundir los resultados de las pruebas serológicas para infecciones recientes y resultan en mala clasificación: el uso de TARV y una cuenta baja de CD4⁺ sugerente de Sida (6).

Para esta evaluación, los autores incluyeron en el ensayo HRM un panel de muestras de infecciones de larga duración; algunos con TARV y otros con Sida (CD4⁺<50 células/mm³). En el caso del gen *pol*, no encontraron diferencias significativas entre los *HRM scores* de las muestras de larga duración provenientes de personas en TARV en comparación con las que no tenían TARV, ni en las muestras de las personas con Sida vs las que no tenían aún la enfermedad. Esto soporta la idea de aplicar el *HRM* como una técnica molecular para diferenciar con menor error las infecciones por VIH recientes de las no recientes, sin los potenciales confusores que impactan a las pruebas serológicas (6).

- *HRM* y el material biológico utilizado.

En este trabajo encontramos que la cantidad y el tipo de material biológico utilizado para el ensayo *HRM* no tiene implicaciones en los resultados. Existen publicaciones que detallan que con el *HRM* es posible evaluar la diversidad genética del VIH tanto en RNA como en DNA proviral. Para el caso de las aplicaciones del ensayo a la estimación de incidencia, se sugiere que tiene mayor sentido analizar los virus del pool activo de replicación; es decir el RNA viral en plasma más que el DNA proviral que es muy probable que incluya secuencias virales de virus que circularon en la persona de manera anterior a la toma de muestra y/o momento del estudio (6). Lo descrito valida los resultados que aquí presentamos, ya que surgen de muestras de RNA obtenidas de plasma de personas VIH positivas.

En este mismo sentido, existe evidencia de que los resultados del ensayo de HRM no se ven afectados por utilizar diferentes concentraciones de material genético molde. Un artículo publicado por James y colaboradores, detalla que sus resultados fueron reproducibles aún utilizando volúmenes de muestra diferente (0.1 vs 0.5mL), muestras provenientes de personas con carga viral diferente (intervalo de 2,000 a 50,000 copias/mL) y número de copias de RNA usadas para preparar la muestra (intervalo de 100 a 5,000 copias de RNA-VIH) (6,119).

En este estudio los volúmenes de muestra utilizados fueron de 10µL de RNA por reacción, para el caso de las muestras problema. En el caso de los controles positivos para la estandarización de la reacción utilizamos del orden de 134 ng/ µL de DNA, con sus respectivas diluciones. Pese a lo anterior, encontramos los mismos resultados en el ensayo HRM lo que coincide con que la cantidad de material biológico no interfiere con los resultados.

Adicionalmente, en nuestro estudio nos planteamos a manera de criterio de selección para la estandarización del ensayo RT-qPCR y *HRM* que las muestras provinieran de

personas con carga viral detectable. Para el caso de la Clínica Especializada Condesa, de donde se obtuvieron las muestras el límite menor de detectabilidad es de 35 copias/mL; así que lo que buscábamos al solo incluir detectables era tener suficiente material biológico. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente la evidencia sugiere que no es necesario tener una cuantificación de carga viral de VIH o cuenta de CD4⁺ previa a la realización del ensayo (5,45).

- *HRM* en población de HSH.

Al respecto de la población analizada en este trabajo, nosotros aplicamos el ensayo *HRM* para evaluar las infecciones en HSH. Se puede pensar que al ser esta una población con prácticas sexuales de riesgo, se hace difícil que las técnicas utilizadas para el diagnóstico o estimación de incidencia se apliquen de la misma forma que en la población en general. No obstante, estudios previos han reportado la reproducibilidad del ensayo *HRM* en poblaciones con distintas características como: la raza, afroamericanos, caucasicos y latinos (5,117); el sexo, hombres y mujeres (5); la edad, niños de semanas de nacidos, 1 o 2 años, 8 años y adultos (6,45,115,118,119,129); tipo de VIH (5,119) y prácticas de riesgo, HSH o usuarios de drogas inyectables (6,118), entre otras.

- *HRM* y *HRM scores* en infecciones recientes y gen analizado.

En nuestro trabajo encontramos que las infecciones recientes resultan con menores *HRM scores* en comparación con infecciones de larga duración. Estos hallazgos coinciden con lo publicado sobre *HRM* en VIH. A este respecto, Cousins y colaboradores encontraron también para el gen pol, una asociación entre la etapa de la infección y el *HRM score*; los menores correspondientes a infecciones recientes en su población de adultos analizados con estatus confirmado por expediente clínico (115). Así mismo, Chen y colaboradores reportan que los hombres adultos con infecciones agudas o recientes por VIH presentan menores *HRM scores* en los tres genes estructurales de VIH, en comparación con las personas con infecciones por VIH de larga duración; y que esta asociación es independiente de la TARV y de la resistencia a ARV (117).

En el caso de estudios con niños VIH positivos, debido a que su infección fue adquirida de manera vertical, su edad es una variable surrogada de la temporalidad de infección. En este caso, diversas publicaciones detallan una asociación entre la edad de los niños y los *HRM scores* encontrados tanto en *gag*, *pol* y *env* (45,118,119,129). En una cohorte de niños en Uganda, James y colaboradores encontraron que para el gen *pol*, los *HRM scores* encontrados para cada grupo etario iban aumentando al igual que los años. Para sus plásmidos control reportan *HRM scores* de 3.5, para niños de 6-8 semanas de edad 4.1, niños de 12 meses 4.3 y para niños de 18 meses 4.4 (119,129). Igualmente, Towler y colaboradores publican un estudio donde analizan la diversidad genética del VIH en pares de madres y sus recién nacidos, ambos VIH positivos. Ellos encontraron mayores *HRM scores* en las madres en comparación con los de sus recién nacidos, que a su vez presentaron mayores *HRM scores* que los plásmidos control, 5.7, 4.3 y 3.4, respectivamente (45).

A pesar de que en este trabajo solo evaluamos un gen estructural del VIH, *pol*, existen varios reportes para los otros dos genes: *gag* y *env* que describen también *HRM scores* menores para infecciones recientes (<4.5), independientemente del gen analizado (47,129). Sin embargo, se recomienda analizar más de un gen con la finalidad de evitar resultados modificados por otros eventos en VIH como los cambios en la diversidad de ciertos fragmentos en respuesta a presiones de selección (por ejemplo a los medicamentos ARV) (129).

- *HRM* y secuenciación del fragmento analizado.

El ensayo *HRM* se propone como una técnica que nos permite evaluar la diversidad genética de una fragmento nucleotídico sin la necesidad de secuenciar el producto de interés (115).

En este trabajo solo se secuenciaron 27 muestras, 4 recientes y 23 de larga duración. La primera utilidad de la secuenciación surge de la necesidad técnica de corroborar los productos amplificados. Debido a que en el trabajo se encontraron T_m 's con diferencias

>0.5°C en los amplicones de *pol* 199pb, sin importar si se utilizó DNA o RNA como material biológico, se recurrió al estándar de oro para obtener la secuencia de los fragmentos (secuenciación, en este caso Sanger) y con ello al realizar el alinamiento en Blast se corroboró que se trataba del producto esperado. Resultó necesario determinar que los productos amplificados correspondían a *pol* 199pb, ya que el tener diferentes T_m 's podría invalidar el ensayo de qPCR y eso impediría el llevar a cabo el *HRM*.

Como segunda utilidad, la secuencia obtenida de los 27 productos nos permitió generar dos colecciones de secuencias (las recientes y las de larga duración) como paso inicial del cálculo de la diversidad nucleotídica (π) en el fragmento amplificado. Resultado de esto, obtuvimos que el valor de π fue menor en las infecciones recientes que en las de larga duración (0.0353 vs 0.0446), lo que corrobora lo encontrado en el ensayo *HRM*: *scores* menores para infecciones recientes y mayores para las de larga duración.

Lo encontrado por nosotros es similar a las publicaciones que reportan que los datos de diversidad genética calculados en los fragmentos de interés (porcentaje de diversidad, el porcentaje de complejidad y el índice de Shannon) a partir de la secuenciación coinciden con lo encontrado en el ensayo *HRM*; es decir encontraron menores *HRM scores* en las muestras con datos sugerentes de menor diversidad, de acuerdo a los parámetros de secuenciación (47).

En el estudio de Towler y colaboradores donde evaluaron secuencias de madres e hijos VIH positivos, también encontraron que la diversidad genética calculada con los datos a partir de secuenciación era mayor en las madres que en los hijos (3.51 vs 0.31, respectivamente); y que esto correspondía con los *HRM scores* de ambos grupos (mayores en madres que en hijos). A su vez esto indicaba la temporalidad de la infección: *HRM scores* menores en hijos, ya que tenían infecciones recientes (45).

11. CONCLUSIONES

- El diseño y propuesta de un *RITA* siguiendo las especificaciones de la OMS, permitió conjuntar la información clínica de los HSH y sus resultados de los

ensayos serológicos. El resultado del algoritmo y la corrección de Hargrove y colaboradores, mostraron ser una herramienta eficiente para el cálculo de la incidencia estimada a partir de estudios de tipo transversal.

- Los factores o variables que explican la prevalencia difieren de aquellos que explican a las infecciones recientes (incidencia). Por tanto, aquellos relacionados con cada estimador son clave para las intervenciones preventivas.
- La transmisión del VIH puede abordarse desde diferentes niveles; sin embargo, en este trabajo, se ha demostrado que las variables agrupadas pueden conducir a una explicación de la disparidad regional de la prevalencia y la incidencia del VIH. Es por todo esto que aclarar y comprender esta dinámica permitiría enfocar los programas hacia la prevención del VIH o hacia el tratamiento de las personas ya infectadas, de acuerdo con su dinámica de transmisión y su región geográfica específica.
- Es factible realizar la metodología *HRM* con datos obtenidos de qPCR y RT-qPCR, no sólo a partir de PCR punto final (como es el caso de todas las publicaciones de *HRM* en VIH). A pesar del tamaño de muestra reducido, los *HRM scores* encontrados para infecciones recientes son menores con respecto de los *scores* de las infecciones de larga duración; y coinciden con los publicados en la literatura. Además de que fueron corroborados con el cálculo de la diversidad genética (π) de los productos secuenciados ($n= 27$). Los resultados encontrados van acorde con la premisa de que a menor duración de la infección menor diversidad genética del VIH y por ende menor *HRM score*; apoyando así la propuesta de la diversidad genética viral como biomarcador de temporalidad de infección.
- El diseño, la información del cuestionario y la muestra biológica recolectada en la encuesta de 2013 se pueden utilizar mediante la ampliación de los procedimientos de laboratorio y el análisis de datos, para obtener más información sobre la dinámica de transmisión del virus; así como para determinar la carga viral de la

comunidad, la carga viral de la población, la resistencia a los antirretrovirales u otras infecciones de transmisión sexual (ITS) (13,25,40,41). Se requieren investigaciones futuras con diferentes enfoques para comprender y aclarar los factores que podrían explicar la disparidad regional de la prevalencia y la incidencia del VIH/Sida entre los HSH.

12. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.

Las principales limitaciones de este trabajo son las siguientes:

- 1) Los resultados obtenidos sólo representan a la población HSH que acude a sitios de encuentro; es decir, probablemente se trate de individuos con un buen estado de salud general, el cual les permite acudir a estos sitios.
- 2) Los datos aquí presentados muy probablemente no describen lo que sucede actualmente con la epidemia de VIH entre HSH que acuden a sitios de encuentro. Lo anterior de acuerdo con la fecha en que se realizó la encuesta (2013) y a la de los análisis aquí detallados (2019).
- 3) La encuesta previa de la cual proceden las muestras biológicas y el banco de datos, se llevo a cabo solamente en algunas ciudades representativas de cada región geográfica analizada. Es por ello, que los resultados podrían no describir exactamente lo que sucede en toda la región.
- 4) Existen otras pruebas más adecuadas para la determinación de incidencia como la prueba serológica LAg-Avidity y la secuenciación. Sin embargo, en este trabajo se utilizó la prueba BED en respuesta a la logística del proyecto. Así mismo, el cálculo simple del FRR utilizado en el RITA podría estar confundiendo los verdaderos resultados. Sin embargo, el FRR utilizado cumple con el requisito de provenir de la población específica y región específica de este estudio lo que hace valioso los resultados; dado que la determinación de dicho parámetro responde a variables

como la prevalencia, incidencia, tamaño de muestra, cobertura de tratamiento, subtipo de VIH, etcétera, que para ambos casos son similares.

- 5) La técnica molecular propuesta *HRM* se estandarizó solamente a partir de muestras de plasma y producto de PCR, tanto con DNA como con RNA.
- 6) El tamaño de muestra utilizado para la técnica molecular propuesta *HRM*, fue muy pequeño para infecciones recientes por VIH (n=4); sin embargo los resultados coinciden con lo publicación en materia de HRM y diversidad genética.

13. PERSPECTIVAS.

- Experimentar la extracción de ácidos nucleicos a partir de *DBS* colectados recientemente, para su procesamiento en los análisis moleculares propuestos en este trabajo.
- Corroborar los resultados del ensayo *HRM* con un mayor número de muestras, de estatus conocido.
- El diseño, la información del cuestionario y la muestra biológica colectada en la encuesta de 2013, se puede utilizar para obtener más información sobre la dinámica de transmisión del virus explorando nuevas variables, carga viral previa estandarización de la extracción de ácidos nucleicos, resistencia antiretroviral y otras ITS.

14. ANEXOS.

ANEXO 1. *Sedia™ BED HIV-1 Incidence EIA*: Prueba serológica para detección de infección reciente por VIH. Disponible en la página: (<http://www.sediabio.com/products/bed-eia>).

**Sedia™ BED HIV-1
Incidence EIA**

*Enzyme Immunoassay for Population
Estimates of HIV-1 Incidence*

Cat. No. 1000

FOR RESEARCH USE ONLY
not intended for use in
diagnostic procedures

Includes Two Packs:

3012 - Refrigerator Pack (Store at 2 to 8°C)

3013 - Freezer Pack (Store at -25°C to -10°C)

Manufactured in the USA
Sedia Biosciences Corporation
Portland, Oregon USA
+1-(503)-459-4159

Copyright 2014. Sedia Biosciences Corporation
All rights reserved

ANEXO 2. Carta de autorización de uso de muestras e información.



**Centro de Investigación en Sistemas de Salud
Dirección de Área: Innovación de Servicios y Sistemas de Salud
Mtro. Sergio Antonio Bautista Arredondo**

Cuernavaca, Morelos, a 16 de mayo de 2018

Comisión de Investigación.

Presente

Por este medio, autorizo a la alumna Dayana Nicté Vergara Ortega, responsable del protocolo de tesis de doctorado "Dinámica de la transmisión del VIH en hombres que tienen sexo con hombres que acuden a sitios de encuentro" el uso del banco de muestras de sangre seca en papel filtro generado a partir del proyecto "ENCUESTA DE SEGUIMIENTO Y EVALUACIÓN DE IMPACTO DE LAS ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN" del cual fungí como investigador responsable, así mismo, le autorizo el uso de la base de datos generada en dicho proyecto, en el cual las muestras se identificaron sólo con una clave.

Atentamente.



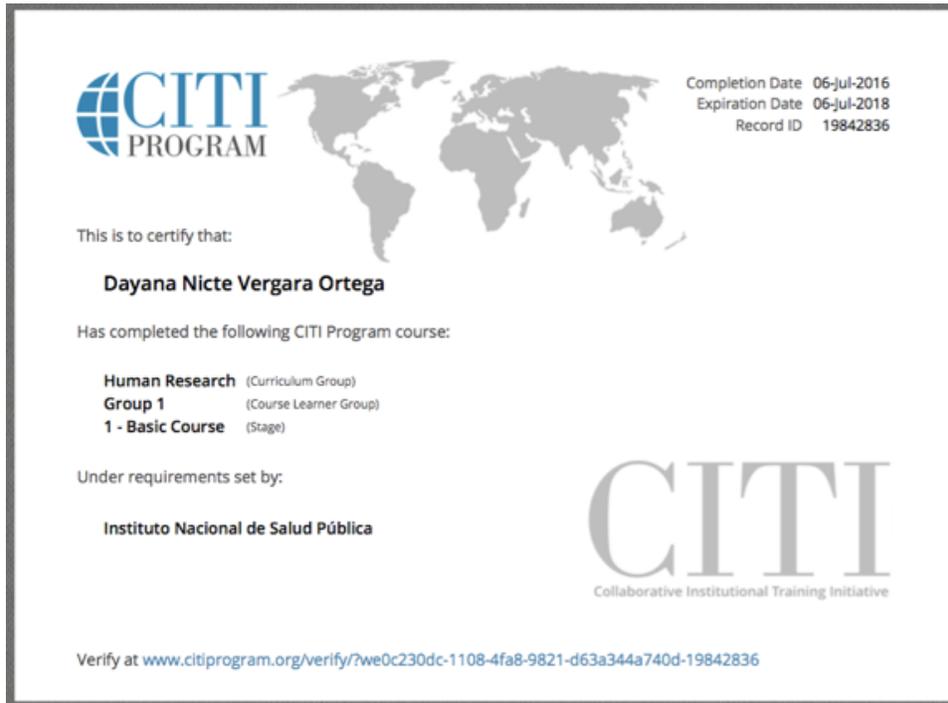
Mtro. Sergio A. Bautista Arredondo
Director de Innovación de Servicios y Sistemas de Salud del CISS
Instituto Nacional de Salud Pública (INSP)

Telefono: +52 (777) 329 3068
+52 (777) 329 3000 Ext.5451
e-mail: sbautista@insp.mx
web: www.insp.mx

Avenida Universidad 655
Cerrada Los Pinos y Caminera
Colonia Santa María Ahuacatitlán
62100 Cuernavaca, Morelos, México
conm: (777) 329 3000

www.insp.mx

ANEXO 3. Acreditación del curso de bioética del CITI Program.



ANEXO 4. Acreditación del curso de bioseguridad del CITI Program: programa básico.



ANEXO 5. Acreditación del curso de bioseguridad del CITI Program: capacitación inicial.



Completion Date 27-Apr-2018
Expiration Date 27-Apr-2019
Record ID 24920983

This is to certify that:

Dayana Nichte Vergara Ortega

Has completed the following Citi Program course:

Initial Biosafety Training (Curriculum Group)
Initial Biosafety Training (Course Learner Group)
1 - Biosafety/Biosecurity (Stage)

Under requirements set by:

Instituto Nacional de Salud Pública



Verify at www.citiprogram.org/verify/?wc7df7085-9e3b-4be0-965a-f001519e2c87-24920983

ANEXO 6. *HIV Ag/Ab Combo, Architect, Abbott Diagnostics Division™*: Prueba de detección de Ag y Ac de VIH. Disponible en la página: (<http://www.illexmedical.com/files/PDF/HIVAgAbCombo.pdf>).



en

HIV Ag/Ab Combo

REF 4J27

48-3504/R4

B4J270

Read Highlighted Changes
Revised February, 2009

HIV Ag/Ab Combo

Customer Service

For additional product information, please contact your local customer service organization.

This package insert must be read carefully prior to use. Package insert instructions must be followed accordingly. Reliability of assay results cannot be guaranteed if there are any deviations from the instructions in this package insert.

Key to symbols used			
REF	List Number	ASSAY CD-ROM	Assay CD-ROM
IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device	SN	Serial Number
LOT	Lot Number	CONTROL NO.	Control Number
	Expiration Date	REAGENT LOT	Reagent Lot
	Store at 2-8°C	REACTION VESSELS	Reaction Vessels
	Consult instructions for use	SAMPLE CUPS	Sample Cups
	Manufacturer	SEPTUM	Septum
		REPLACEMENT CAPS	Replacement Caps

See **REAGENTS** section for a full explanation of symbols used in reagent component naming.



ANEXO 7. ZYMO RESEARCH Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit: extracción de DNA a partir de estuche comercial. Disponible en la página (https://files.zymoresearch.com/protocols/d4068_d4069_quick-dna_miniprep_plus_kit.pdf).

INSTRUCTION MANUAL

Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit Catalog Nos. D4068 & D4069

Highlights

- Extract high-quality DNA easily and reliably from any biological fluids, cultured/monolayer cells, or solid tissues.
- **Zymo-Spin™ Technology** ensures DNA is ready for all sensitive downstream applications such as qPCR, DNA-sequencing, arrays, and methylation analysis.

Contents

Product Contents & Specifications	1
Sample Sources	2 – 3
Product Description	4
Purification Guide	5
Protocol & Reagent Preparation	6
Appendices	
A. Cell Monolayer/Buccal Cell Collection and Preparation	7
B. Samples in DNA/RNA Shield™	8
C. Nucleated Blood Samples	9
D. Hair and Feathers	10
E. FFPE Tissue	11
F. Samples Collected onto Storage Papers/Cards	12
G. Quick Protocol	13 – 14
Troubleshooting	15 – 17
Ordering Information	18

ANEXO 8. Protocolo fenol/cloroformo: extracción de DNA a partir de mezclas con solventes.

A. Agregar en un tubo 200 µl de muestra y un volumen igual de fenol.

- B. Mezclar vigorosamente (vórtex®) y centrifugar por 3 minutos a 16000g a temperatura ambiente (15-25°C).
- C. Transferir la fase superior o acuosa a un tubo nuevo y desechar el resto.
- Añadir un volumen igual de fenol/cloroformo (1:1, v/v) y repetir el paso A, B y C.
 - Añadir un volumen igual de cloroformo y repetir el paso A, B y C.
- *El cloroformo debe prepararse en una solución v/v 24:1, cloroformo y alcohol isoamílico.
- ✓ Recuperación del DNA por precipitación con etanol absoluto: estimar el volumen de la solución y mezclar con dos volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C), mezclar bien y almacenar a -20°C por 1 hora.
 - ✓ Centrifugar a temperatura ambiente por 10 minutos a 13000g.
 - ✓ Retirar el sobrenadante y dejar el tubo en una posición invertida sobre papel absorbente.
 - ✓ Resuspender el pellet de DNA en 100 µl agua MiliQ estéril.
 - ✓ Incubar la solución a 37°C por 5 minutos.
 - ✓ Cuantificar el DNA obtenido.

ANEXO 9. QIAamp Viral RNA Mini Kit® de QIAGEN: extracción de RNA a partir de estuche comercial. Disponible en la página (<https://www.qiagen.com/us/products/diagnostics-and-clinical-research/sample-processing/qiaamp-viral-rna-mini-kit/#orderinginformation>).

March 2018

QIAamp[®] Viral RNA Mini Handbook

For purification of viral RNA
from plasma, serum, cell-free
body fluids and culture
supernatants

— Sample to Insight —



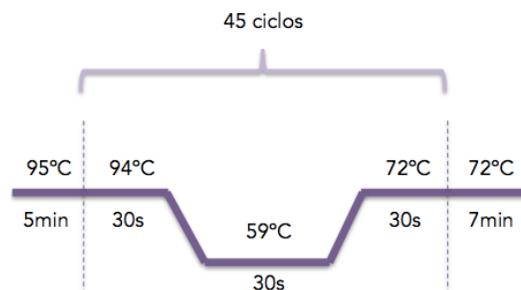
ANEXO 10. Protocolo de PCR en tiempo real (qPCR) para amplificación de *pol* 139 y 199 pb a partir de DNA.

Para ambos ensayos:

- Asegurar la limpieza del material que se va a utilizar, usar puntas estériles.
- Tener calculadas las concentraciones y los volúmenes que serán utilizados.
- Atemperar las muestras y reactivos.
- Realizar la mezcla de reacción de acuerdo con el volumen de reacción recomendado.
- Utilizar un control positivo y uno negativo para cada corrida.
 - ❑ Previamente, PCR punto final para la amplificación del fragmento de *pol* 139pb con el propósito de corroborar el tamaño de banda.

Mix de reacción	[final]	Volumen final (1 reacción de 25µL)
Buffer KCl [10x]	1x	2.5
MgCl ₂ [25mM]	2.5mM	2.5
dNTP's [10mM]	0.32mM	0.8
Taq [5u/µL]	0.1u/µL	0.5
Oligo Forward-POL3F [10µM]	1µM	2.5
Oligo Reverse-POL3R [10µM]	1µM	2.5
Agua	---	8.7
DNA molde [1-100ng]	---	5

- Programa de PCR

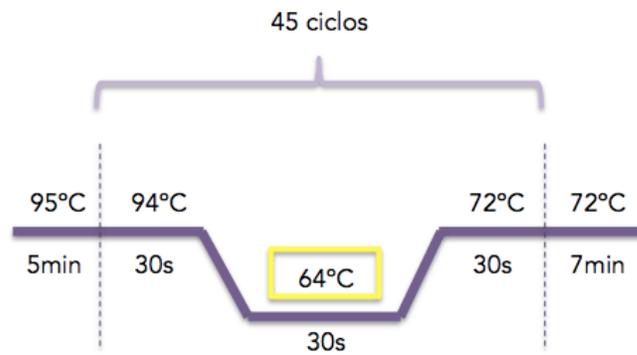


- ❑ PCR punto final para la amplificación del fragmento de *pol* 199pb con el propósito de corroborar el tamaño de banda.

Mix de reacción	[final]	Volumen final (1 reacción de 25µL)
-----------------	---------	---------------------------------------

Buffer KCl [10x]	1x	2.5
MgCl ₂ [25mM]	2.5mM	2.5
dNTP's [10mM]	0.32mM	0.8
Taq [5u/μL]	0.1u/μL	0.5
Oligo Forward-POL3F [10μM]	1μM	2.5
Oligo Reverse-POL3R nuevo [20μM]	1μM	2.5
Agua	---	8.7
DNA molde [1-100ng]	---	5

- Programa de PCR



- PCR en tiempo real (qPCR) para amplificación de *pol* 199 pb. Uso de oligonucleótidos sintetizados en IDT.

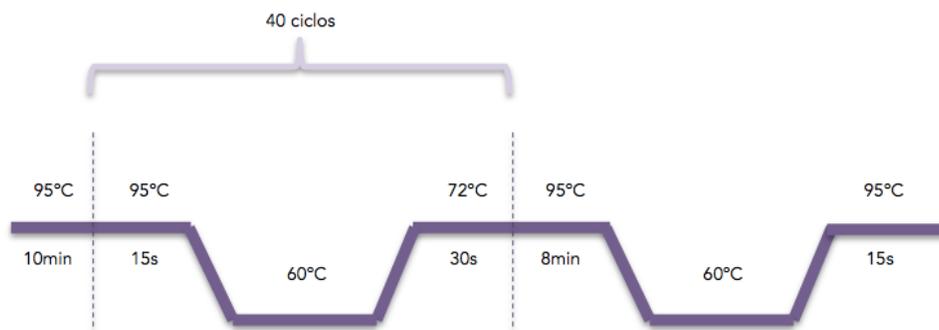
Mix de reacción	[final]	Volumen final (1 reacción de 12μL)
-----------------	---------	---------------------------------------

Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	1X	6
Oligo Forward- POL3F [10µM]	0.3µM	0.36
Oligo Reverse-POL3R nuevo [20µM]	0.6µM	0.36
Agua	---	4.28
DNA molde [1-100ng]	---	1

- ❑ PCR en tiempo real (qPCR) para amplificación de *pol* 199 pb. Uso de oligonucleótidos sintetizados en la unidad de síntesis y secuenciación del IBT, UNAM.

Mix de reacción	[final]	Volumen final (1 reacción de 12µL)
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	1X	6
Oligo Forward- POL3F [12.1µM]	0.3µM	0.30
Oligo Reverse-POL3R nuevo [25.3µM]	0.6µM	0.30
Agua	---	4.40
DNA molde [1-100ng]	---	1

- Programa de qPCR

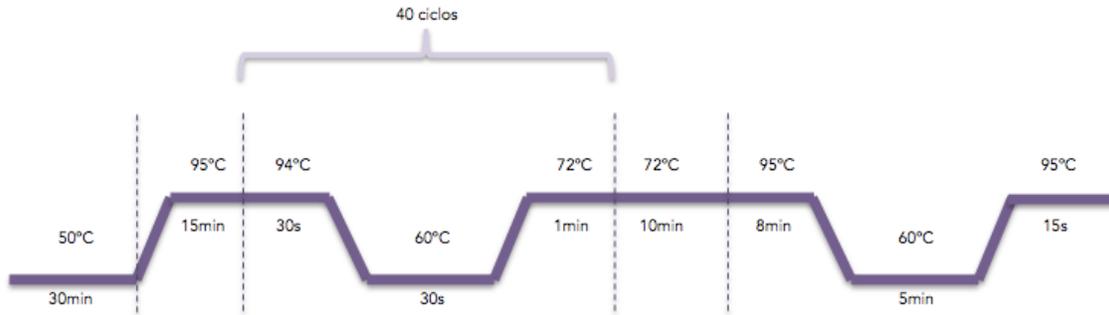


ANEXO 11. Protocolo de PCR en tiempo real con reversotranscripción (RT-qPCR) para amplificación de *pol* 199 pb a partir de RNA.

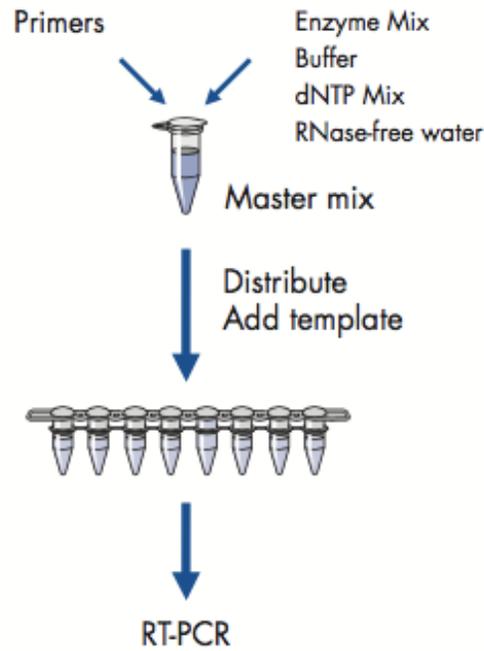
- ❑ Uso de oligonucleótidos sintetizados en la unidad de síntesis y secuenciación del IBT, UNAM.

Mix de reacción	[final]	Volumen final (1 reacción de 25µL)
Agua libre de nucleasas	---	3.7
Buffer one step [5X]	1X	5.0
dNTP's [10mM]	0.4mM	1.0
Oligo Forward- <u>POL3F</u> [12.1µM]	0.6µM	1.2
Oligo Reverse- <u>POL3R nuevo</u> [25.3µM]	0.6µM	0.6
Mix de la enzima	---	1.0
SYBR Green [10X]	1X	2.5
RNA molde	---	10

- Programa de RT-qPCR



QIAGEN OneStep RT-PCR Procedure



October 2012

QIAGEN® OneStep RT-PCR Handbook

For fast and highly sensitive one-step RT-PCR



Sample & Assay Technologies

Disponible en la página (<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/pcr-qpcr/pcr-enzymes-and-kits/one-step-rt-pcr/qiagen-onestep-rt-pcr-kit/#orderinginformation>).

15. REFERENCIAS.

1. Mesa-Mazo MJ, Vergaño-Salazar JG, Sánchez-Botero CE, Muñoz-Loaiza A. Modelo matemático para la dinámica de transmisión del VIH/SIDA en una población sexualmente activa. *Rev Salud Pública*. abril de 2010;volumen 12(número 2):308-16.
2. Yeghiazarian L, Cumberland WG, Yang OO. A stochastic multi-scale model of HIV-1 transmission for decision-making: application to a MSM population. *PloS One*. 2013;8(11):e70578.
3. Meyers K, Qian H, Wu Y, Lao Y, Chen Q, Dong X, et al. Early Initiation of ARV During Pregnancy to Move towards Virtual Elimination of Mother-to-Child-Transmission of HIV-1 in Yunnan, China. *PloS One*. 2015;10(9):e0138104.
4. Sun X, Xiao Y, Tang S, Peng Z, Wu J, Wang N. Early HAART Initiation May Not Reduce Actual Reproduction Number and Prevalence of MSM Infection: Perspectives from Coupled within- and between-Host Modelling Studies of Chinese MSM Populations. *PloS One*. 2016;11(3):e0150513.
5. Cousins MM, Konikoff J, Laeyendecker O, Celum C, Buchbinder SP, Seage GR, et al. HIV diversity as a biomarker for HIV incidence estimation: including a high-resolution melting diversity assay in a multiassay algorithm. *J Clin Microbiol*. enero de 2014;52(1):115-21.
6. Cousins MM, Laeyendecker O, Beauchamp G, Brookmeyer R, Towler WI, Hudelson SE, et al. Use of a high resolution melting (HRM) assay to compare gag, pol, and env diversity in adults with different stages of HIV infection. *PloS One*. 2011;6(11):e27211.
7. Patiño-Galindo JA, Thomson MM, Pérez-Álvarez L, Delgado E, Cuevas MT, Fernández-García A, et al. Transmission dynamics of HIV-1 subtype B in the Basque Country, Spain. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. 26 de febrero de 2016;40:91-7.
8. Chan PA, Hogan JW, Huang A, DeLong A, Salemi M, Mayer KH, et al. Phylogenetic Investigation of a Statewide HIV-1 Epidemic Reveals Ongoing and Active Transmission Networks Among Men Who Have Sex With Men. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999. 1 de diciembre de 2015;70(4):428-35.
9. Li Z, Liao L, Feng Y, Zhang J, Yan J, He C, et al. Trends of HIV subtypes and phylogenetic dynamics among young men who have sex with men in China, 2009-2014. *Sci Rep*. 2015;5:16708.

10. Ragonnet-Cronin M, Hu YW, Morris SR, Sheng Z, Poortinga K, Wertheim JO. HIV transmission networks among transgender women in Los Angeles County, CA, USA: a phylogenetic analysis of surveillance data. *Lancet HIV*. marzo de 2019;6(3):e164-72.
11. Oster AM, France AM, Panneer N, Bañez Ocfemia MC, Campbell E, Dasgupta S, et al. Identifying Clusters of Recent and Rapid HIV Transmission Through Analysis of Molecular Surveillance Data. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999. 15 de diciembre de 2018;79(5):543-50.
12. Boily M-C, Godin G, Hogben M, Sherr L, Bastos FI. The impact of the transmission dynamics of the HIV/AIDS epidemic on sexual behaviour: a new hypothesis to explain recent increases in risk taking-behaviour among men who have sex with men. *Med Hypotheses*. 2005;65(2):215-26.
13. Mehta SR, Wertheim JO, Brouwer KC, Wagner KD, Chaillon A, Strathdee S, et al. HIV Transmission Networks in the San Diego-Tijuana Border Region. *EBioMedicine*. octubre de 2015;2(10):1456-63.
14. Bautista-Arredondo S, Colchero MA, Romero M, Conde-Glez CJ, Sosa-Rubí SG. Is the HIV epidemic stable among MSM in Mexico? HIV prevalence and risk behavior results from a nationally representative survey among men who have sex with men. *PloS One*. 2013;8(9):e72616.
15. Bautista-Arredondo S, Colchero A, Sosa-Rubí SG, Romero-Martínez M, Conde-González C. Resultados principales de la encuesta de ser-prevalencia en sitios de encuentro de hombres que tienen sexo con hombres. (Resumen ejecutivo). Ser Resúmenes Ejec Inst Nac Salud Pública Cent Investig En Eval Encuestas CIEE. septiembre de 2012;Volumen 3(Número 3):1-5.
16. Colchero MA, Bautista-Arredondo S, Cortés-Ortiz MA, Romero-Martinez M, Salas J, Sosa-Rubí SG, et al. Impact and economic evaluations of a combination prevention programme for men who have sex with men in Mexico. *AIDS Lond Engl*. enero de 2016;30(2):293-300.
17. Fauci AS, Desrosiers RC. Pathogenesis of HIV and SIV. En: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editores. *Retroviruses* [Internet]. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997 [citado 3 de abril de 2016]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19359/>
18. Fauci AS, Kasper D, Hauser S, Jameson L, Loscalzo J, Longo AS. *Retrovirus humanos*. En: *Harrison: principios de medicina interna* [Internet]. 18ª edición. McGraw-Hill Interamericana; 2012 [citado 3 de abril de 2016]. p. 1500-88. Disponible en: http://mcgraw-hill.com.mx/harrison18/tabla_contenido/tabla_contenido.pdf

19. OMS | VIH/SIDA [Internet]. WHO. [citado 3 de abril de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/es/>
20. Vogt PK. Historical Introduction to the General Properties of Retroviruses. En: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editores. Retroviruses [Internet]. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997 [citado 3 de abril de 2016]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19388/>
21. Vázquez-Campuzano R. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Departamento de microbiología y parasitología, recursos en virología. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); 2015.
22. Ganser-Pornillos B, Yeager M, Sundquist WI. The Structural Biology of HIV Assembly. *Curr Opin Struct Biol.* abril de 2008;18(2):203.
23. AIDSinfo [Internet]. [citado 7 de abril de 2016]. Disponible en: <http://www.aidsinfoonline.org/devinfo/libraries/asp/home.aspx>
24. HIVinSITE. AIDS Pathology [Internet]. [citado 3 de abril de 2016]. Disponible en: <http://library.med.utah.edu/WebPath/TUTORIAL/AIDS/AIDS004.html>
25. Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol.* 16 de marzo de 2012;10(4):279-90.
26. Moore MD, Hu W-S. HIV-1 RNA Dimerization: It Takes Two to Tango. *AIDS Rev.* 2009;11(2):91-102.
27. Murray JM, Kelleher AD, Cooper DA. Timing of the Components of the HIV Life Cycle in Productively Infected CD4+ T Cells in a Population of HIV-Infected Individuals. *J Virol.* octubre de 2011;85(20):10798-805.
28. Rivera Morales LG, Luna Cruz IE, Ramos Alfano G, Ordaz Sánchez MI, Ramos Jiménez J, López Guillén P, et al. Diversidad genética del virus de la inmunodeficiencia humana: una perspectiva general. *Rev Salud Pública Nutr [Internet].* 2005 [citado 22 de marzo de 2015];6(1). Disponible en: <http://biblat.unam.mx/es/revista/revista-salud-publica-y-nutricion/articulo/diversidad-genetica-del-virus-de-la-inmunodeficiencia-humana-una-perspectiva-general>
29. Rivera Morales LG. El impacto de la diversidad genética en la infección por el VIH-1. *Rev Salud Pública Nutr [Internet].* 2010 [citado 22 de marzo de 2015];11(3). Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/xi/3/editorial/editorial.htm>
30. Rivera-Morales LG, Novitsky VA, Trujillo JR, Lavallo-Montalvo C, Cano-Dominguez C, Ramos-Jimenez J, et al. The molecular epidemiology of HIV type 1 of men in Mexico. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1 de enero de 2001;17(1):87-92.

31. Yabar CA, Acuña M, Gazzo C, Salinas G, Cárdenas F, Valverde A, et al. New subtypes and genetic recombination in HIV type 1-infecting patients with highly active antiretroviral therapy in Peru (2008-2010). *AIDS Res Hum Retroviruses*. diciembre de 2012;28(12):1712-22.
32. Baral S, Sifakis F, Masenior, N. A systematic review of HIV prevalence among MSM in Asia, Latin America, and Africa from 2000-2008 [Internet]. MSMGF Men Who Have Sex With Men Global Forum. 2008 [citado 6 de abril de 2018]. Disponible en: <http://msmgf.org/a-systematic-review-of-hiv-prevalence-among-msm-in-asia-latin-america-and-africa-from-2000-2008/>
33. Murphy G, Parry JV. Assays for the detection of recent infections with human immunodeficiency virus type 1. *Eurosurveillance*. 2008;13(issues 27-39):314-20.
34. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. *Course of Infection with HIV and SIV* [Internet]. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997 [citado 6 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19374/>
35. Ospina O S. Diagnóstico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Infectio*. diciembre de 2006;10(4):273-8.
36. Secretaría de Salud de México, Instituto Nacional de Salud Pública de México, CENSIDA. 25 años de sida en México: Logros, desaciertos y retos. *Salud Pública México*. agosto de 2010;52(4):378-9.
37. Secretaría de Salud, Subsecretaría de prevención y promoción de la salud. Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica del VIH-Sida [Internet]. Dirección general de Epidemiología; 2012 [citado 5 de abril de 2016]. Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig_epid_manuales/30_2_012_Manual_VIH-SIDA_vFinal_1nov12.pdf
38. Park SY, Goeken N, Lee HJ, Bolan R, Dubé MP, Lee HY. Developing high-throughput HIV incidence assay with pyrosequencing platform. *J Virol*. marzo de 2014;88(5):2977-90.
39. Park SY, Love TMT, Nelson J, Thurston SW, Perelson AS, Lee HY. Designing a genome-based HIV incidence assay with high sensitivity and specificity. *AIDS Lond Engl*. 23 de octubre de 2011;25(16):F13-19.
40. Murphy G, Pilcher CD, Keating SM, Kassanjee R, Facente SN, Welte A, et al. Moving towards a reliable HIV incidence test - current status, resources available, future directions and challenges ahead. *Epidemiol Infect*. 2017;145(5):925-41.
41. Meixenberger K, Hauser A, Jansen K, Yousef KP, Fiedler S, von Kleist M, et al.

Assessment of ambiguous base calls in HIV-1 pol population sequences as a biomarker for identification of recent infections in HIV-1 incidence studies. *J Clin Microbiol.* agosto de 2014;52(8):2977-83.

42. Hauser A, Santos-Hoeverer C, Meixenberger K, Zimmermann R, Somogyi S, Fiedler S, et al. Improved testing of recent HIV-1 infections with the BioRad avidity assay compared to the limiting antigen avidity assay and BED Capture enzyme immunoassay: evaluation using reference sample panels from the German Seroconverter Cohort. *PloS One.* 2014;9(6):e98038.
43. World Health Organization, UNAIDS. WHO | When and how to use assays for recent infection to estimate HIV incidence at a population level [Internet]. WHO Library Cataloguing in Publication Data; 2011 [citado 22 de marzo de 2015]. Disponible en: http://www.who.int/hiv/pub/surveillance/sti_surveillance/en/
44. Kassanjee R, Pilcher CD, Keating SM, Facente SN, McKinney E, Price MA, et al. Independent assessment of candidate HIV incidence assays on specimens in the CEPHIA repository. *AIDS Lond Engl.* 23 de octubre de 2014;28(16):2439-49.
45. Towler WI, James MM, Ray SC, Wang L, Donnell D, Mwatha A, et al. Analysis of HIV diversity using a high-resolution melting assay. *AIDS Res Hum Retroviruses.* agosto de 2010;26(8):913-8.
46. Cousins MM, Konikoff J, Sabin D, Khaki L, Longosz AF, Laeyendecker O, et al. A comparison of two measures of HIV diversity in multi-assay algorithms for HIV incidence estimation. *PloS One.* 2014;9(6):e101043.
47. Cousins MM, Ou S-S, Wawer MJ, Munshaw S, Swan D, Margaret CA, et al. Comparison of a high-resolution melting assay to next-generation sequencing for analysis of HIV diversity. *J Clin Microbiol.* septiembre de 2012;50(9):3054-9.
48. WHO | Guidelines for using HIV testing technologies in surveillance: selection, evaluation and implementation [Internet]. WHO. [citado 28 de marzo de 2018]. Disponible en: http://www.who.int/hiv/pub/surveillance/hiv_testing_technologies/en/
49. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, et al. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N Engl J Med.* 11 de agosto de 2011;365(6):493-505.
50. Palumbo PJ, Wilson EA, Piwowar-Manning E, McCauley M, Gamble T, Kumwenda N, et al. Association of HIV diversity and virologic outcomes in early antiretroviral treatment: HPTN 052. *PloS One.* 2017;12(5):e0177281.
51. Sacks D, Ledwaba J, Morris L, Hunt GM. Rapid Detection of Common HIV-1 Drug Resistance Mutations by Use of High-Resolution Melting Analysis and Unlabeled

Probes. *J Clin Microbiol.* 2017;55(1):122-33.

52. Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y Sida. CENSIDA. Guía de manejo antirretroviral de las personas con VIH. Secretaría de Salud de México, Subsecretaría de prevención y promoción de la salud. Séptima edición; 2015.
53. sida CN para la P y C del V y el. Guía de Manejo Antirretroviral de las Personas con VIH-actualización 2019 [Internet]. gob.mx. [citado 10 de agosto de 2019]. Disponible en: <http://www.gob.mx/censida/documentos/guia-de-manejo-antirretroviral-de-las-personas-con-vih>
54. sida CN para la P y C del V y el. Guía para la detección del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) [Internet]. gob.mx. [citado 7 de septiembre de 2018]. Disponible en: <http://www.gob.mx/censida/articulos/guia-para-la-deteccion-del-virus-de-la-inmunodeficiencia-humana-vih-143342?idiom=es>
55. Medicamentos contra el VIH autorizados por la FDA El VIH/SIDA [Internet]. infoSIDA. [citado 10 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://infosida.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/21/58/medicamentos-contra-el-vih-autorizados-por-la-fda>
56. Guimarães PM de S, Ferreira JL de P, Coelho LPO, Cavalcanti J de S, Lopes GISL, Matsuda EM, et al. Transmitted Drug Resistance Among Recently Diagnosed Adults and Children in São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* diciembre de 2015;31(12):1219-24.
57. Guo H, Xu X, Hu H, Zhou Y, Yang H, Qiu T, et al. Low prevalence of the transmitted HIV-1 drug resistance among newly diagnosed HIV-1 individuals in Jiangsu Province, China during 2009–2011. *BMC Public Health.* 2015;15:120.
58. Zhang J, Guo Z, Yang J, Pan X, Jiang J, Ding X, et al. Genetic diversity of HIV-1 and transmitted drug resistance among newly diagnosed individuals with HIV infection in Hangzhou, China. *J Med Virol.* 1 de abril de 2015;n/a-n/a.
59. Ávila-Ríos S, García-Morales C, Matías-Florentino M, Romero-Mora KA, Tapia-Trejo D, Quiroz-Morales VS, et al. Pretreatment HIV-drug resistance in Mexico and its impact on the effectiveness of first-line antiretroviral therapy: a nationally representative 2015 WHO survey. *Lancet HIV.* 2016;3(12):e579-91.
60. Smyth RP, Davenport MP, Mak J. The origin of genetic diversity in HIV-1. *Virus Res.* noviembre de 2012;169(2):415-29.
61. Abram ME, Ferris AL, Das K, Quinoñes O, Shao W, Tuske S, et al. Mutations in HIV-1 reverse transcriptase affect the errors made in a single cycle of viral replication. *J Virol.* julio de 2014;88(13):7589-601.

62. Abram ME, Ferris AL, Shao W, Alvord WG, Hughes SH. Nature, Position, and Frequency of Mutations Made in a Single Cycle of HIV-1 Replication. *J Virol.* octubre de 2010;84(19):9864-78.
63. Holmes KK, Stamm W, Wasserheit JN, Corey L, Aral SO. The epidemiology of STIs and their social and behavioral determinants: industrialized and developing countries. (Chapter 5). En: *Sexually Transmitted Diseases, Fourth Edition.* 4 edition. New York: McGraw-Hill Professional; 2007. p. pages 53-92.
64. Haile-Selassie H, World Health Organization, World Health Organization, Department of HIV/AIDS, Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), Global Fund to Fight AIDS T and Malaria, et al. WHO HIV drug resistance report 2017. [Internet]. 2017 [citado 10 de agosto de 2019]. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255896/1/9789241512831-eng.pdf>
65. Hargreaves JR, Delany-Moretlwe S, Hallett TB, Johnson S, Kapiga S, Bhattacharjee P, et al. The HIV prevention cascade: integrating theories of epidemiological, behavioural, and social science into programme design and monitoring. *Lancet HIV.* 2016;3(7):e318-322.
66. Kay ES, Batey DS, Mugavero MJ. The HIV treatment cascade and care continuum: updates, goals, and recommendations for the future. *AIDS Res Ther.* 2016;13:35.
67. Chandler CJ, Sang JM, Bukowski LA, Andrade E, Eaton LA, Stall RD, et al. Characterizing the HIV care continuum among a community sample of black men who have sex with men in the United States. *AIDS Care.* julio de 2019;31(7):816-20.
68. Mugavero MJ, Westfall AO, Cole SR, Geng EH, Crane HM, Kitahata MM, et al. Beyond core indicators of retention in HIV care: missed clinic visits are independently associated with all-cause mortality. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 de noviembre de 2014;59(10):1471-9.
69. Kay ES, Batey DS, Mugavero MJ. The HIV treatment cascade and care continuum: updates, goals, and recommendations for the future. *AIDS Res Ther* [Internet]. 8 de noviembre de 2016 [citado 9 de abril de 2019];13. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5100316/>
70. Gordis L. *Epidemiología.* Elsevier España; 2005. 360 p.
71. Schiffer JT, Corey L. New Concepts in Understanding Genital Herpes. *Curr Infect Dis Rep.* noviembre de 2009;11(6):457-64.
72. Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y Sida. CENSIDA. Hoja informativa: La epidemia del VIH y el Sida en México. Secretaría de Salud de México; 2014.

73. Aral SO. Determinants of STD epidemics: implications for phase appropriate intervention strategies. *Sex Transm Infect.* abril de 2002;78 Suppl 1:i3-13.
74. Holmes KK, Wasserheit J, Corey L, Garnett GP, Stamm W. The transmission dynamics of sexually transmitted infections. (Chapter 3). En: *Sexually Transmitted Diseases, Fourth Edition.* 4 edition. New York: McGraw-Hill Professional; 2007. p. pages 27-39.
75. Brunham RC, Plummer FA. A general model of sexually transmitted disease epidemiology and its implications for control. *Med Clin North Am.* noviembre de 1990;74(6):1339-52.
76. Patel P, Borkowf CB, Brooks JT, Lasry A, Lansky A, Mermin J. Estimating per-act HIV transmission risk: a systematic review. *AIDS Lond Engl.* 19 de junio de 2014;28(10):1509-19.
77. Deshpande AK, Jadhav SK, Bandivdekar AH. Possible transmission of HIV Infection due to human bite. *AIDS Res Ther.* 31 de marzo de 2011;8:16.
78. Pretty IA, Anderson GS, Sweet DJ. Human bites and the risk of human immunodeficiency virus transmission. *Am J Forensic Med Pathol.* septiembre de 1999;20(3):232-9.
79. Weller S, Davis K. Condom effectiveness in reducing heterosexual HIV transmission. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002;(1):CD003255.
80. Miller WC, Powers KA, Smith MK, Cohen MS. Community viral load as a measure for assessment of HIV treatment as prevention. *Lancet Infect Dis.* mayo de 2013;13(5):459-64.
81. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidance on community viral load: a family of measures, definitions, and method for calculation. Division of HIV/AIDS Prevention. National Center for HIV/AIDS.; 2011.
82. Hoja informativa 2018 — Últimas estadísticas sobre el estado de la epidemia de sida [Internet]. [citado 1 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://www.unaids.org/es/resources/fact-sheet>
83. Dirección General de Planificación Familiar de la Secretaría de Salud. Encuesta nacional sobre fecundidad y salud 1987. Informe resumido. Programa Mundial de Encuestas Demográficas y de Salud (DHS); 1990.
84. Valdespino JL, García-García M de L, Conde-González CJ, Olaiz-Fernández G, Palma O, Sepúlveda J. Prevalencia de infección por VIH en la población adulta en México: una epidemia en ascenso y expansión. *Salud Pública México.* enero de

2007;49:s386-94.

85. Gutiérrez JP, Sucilla-Pérez H, Conde-González CJ, Izazola JA, Romero-Martínez M, Hernández-Ávila M. Seroprevalencia de VIH en población mexicana de entre 15 y 49 años: resultados de la Ensanut 2012. *Salud Pública México*. agosto de 2014;56(4):323-32.
86. Vigilancia Epidemiológica de casos de VIH/SIDA en México Registro Nacional de Casos de SIDA Actualización al 1er. trimestre del 2019. RN_1erTrim_2019.pdf [Internet]. [citado 10 de agosto de 2019]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/468354/RN_1erTrim_2019.pdf
87. Gayet C. Infecciones de transmisión sexual en México: una mirada desde la historia y el género. Primera edición. México: Colección Ángulos del Sida, Secretaría de Salud; 2015. pag. 369.
88. U. S. Census Bureau DIS. HIV Surveillance Data Base [Internet]. [citado 8 de junio de 2018]. Disponible en: https://www.census.gov/data-tools/demo/hiv/hiv.html?s_appName=hiv&s_ccode=MX&s_popcode=H
89. Perez, H. S., J. P. G. Reyes, A. R. S. Matsumoto. HIV Sero-Prevalence in MSM in 7 Urban Areas in Mexico. 2014; 20th International AIDS Conference, Melbourne, Australia, 7/20-25, Poster MOPE156.
90. Magis-Rodriguez, C., A. Gonzalez-Rodriguez. VCT Sites in MSM from Mexico City: An Opportunity to Action. 2011; International Society of Sexually Transmitted Diseases Research 19th Meeting, Quebec City, Canada, July 2011, Abstract in Sexually Transmitted Infections, vol. 87, suppl. 1, Abstract no. P1-S6.40, pp. A212-A213.
91. Bautista-Arredondo, S., Sosa-Rubi, S. G., Colchero, A. Mapping of MSM Meeting Sites to Measure HIV Prevalence and to Better Target Prevention Interventions in Mexico. 2012; XIX International AIDS Conference, Washington, DC, USA, 7/22-27, Poster TuPe567.
92. Pines HA, Goodman-Meza D, Pitpitan EV, Torres K, Semple SJ, Patterson TL. HIV testing among men who have sex with men in Tijuana, Mexico: a cross-sectional study. *BMJ Open*. 4 de febrero de 2016;6(2):e010388.
93. CENSIDA. El VIH/SIDA en México 2012. Primera edición. Herschel No. 119, 6° Piso Col. Verónica Anzures Del. Miguel Hidalgo, C.P. 11590 México, Distrito Federal: Secretaría de Salud de México, 2012; 2012. 47 p.
94. Ruíz, Veronica, Medina, Y., Iracheta, P., Macías, I., Juarez, L., Rodríguez, E., et al. HIV/STI testing among MARPs in Mexico City: a key first step to improve the cascade of care. *J Int AIDS Soc* 2016 192Suppl 1 21083. 28 de abril de

2016;19(1):Abstract P017.

95. Bravo-García E, M. De Luca, Magis-Rodríguez C. How to select the better sites to focus the prevention strategies in a concentrated epidemic country? The Mexico's proposal for the the Global Fund to Fight AIDS, Tuberculosis and Malaria (GF). En Vienna, Austria,; 2010.
96. Proyecto México VIH/sida, Ronda 9 [Internet]. [citado 26 de abril de 2016]. Disponible en: <http://funsalud.org.mx/portal/proyectos/proyecto-mexico-vihsida-ronda-9/>
97. Bautista-Arredondo, Sosa-Rubí SG, Colchero A. Mapping of MSM Meeting Sites to Measure HIV Prevalence and to Better Target Prevention Interventions in Mexico. Póster presentado en: XIX International AIDS Conference; 2012; Washington, DC, USA.
98. Weir S, Morroni C, Coetzee N, Spencer J, Boerma J. A pilot study of a rapid assessment method to identify places for AIDS prevention in Cape Town, South Africa. *Sex Transm Infect.* abril de 2002;78(Suppl 1):i106-13.
99. von Sydow M, Gaines H, Sönnnerborg A, Forsgren M, Pehrson PO, Strannegård Ö. Antigen detection in primary HIV infection. *Br Med J Clin Res Ed.* 23 de enero de 1988;296(6617):238-40.
100. Duong YT, Qiu M, De AK, Jackson K, Dobbs T, Kim AA, et al. Detection of recent HIV-1 infection using a new limiting-antigen avidity assay: potential for HIV-1 incidence estimates and avidity maturation studies. *PloS One.* 2012;7(3):e33328.
101. Salustiano DM, Lima KO de, Cavalcanti AMS, Diaz RS, Lacerda HR. Comparison among the BED capture enzyme immunoassay test and AxSYM avidity index assay for determining recent HIV infection and incidence in two Voluntary Counselling and Testing Centres in Northeast Brazil. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis.* agosto de 2014;18(4):449-53.
102. UNAIDS Reference Group on estimates, modelling and projections--statement on the use of the BED assay for the estimation of HIV-1 incidence for surveillance or epidemic monitoring. *Releve Epidemiol Hebd.* 27 de enero de 2006;81(4):40.
103. Baker BM, Block BL, Rothchild AC, Walker BD. Elite control of HIV infection: implications for vaccine design. *Expert Opin Biol Ther.* enero de 2009;9(1):55-69.
104. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Interim recommendations for the use of the BED capture enzyme immunoassay for incidence estimation and surveillance. Statement from the Surveillance and Survey and the Laboratory working groups to the Office of the Global AIDS Coordinator.; 2006.

105. Sedia Biosciences Launches the SEDIA BED HIV-1 Incidence EIA [Internet]. [citado 24 de agosto de 2017]. Disponible en: <http://www.sediabio.com/announcements/sedia-biosciences-launches-the-sedia-bed-hiv-1-incidence-eia>
106. Prado BH, Velasco-Mondragón HE. Encuestas transversales. Salud Publica Mex [Internet]. 2000 [citado 7 de mayo de 2016];42(5). Disponible en: <https://iths.pure.elsevier.com/en/publications/encuestas-transversales>
107. Hargrove J, Eastwood H, Mahiane G, van Schalkwyk C. How should we best estimate the mean recency duration for the BED method? PloS One. 2012;7(11):e49661.
108. Hargrove J, van Schalkwyk C, Eastwood H. BED estimates of HIV incidence: resolving the differences, making things simpler. PloS One. 2012;7(1):e29736.
109. Interim Recommendations for the use of the BED capture enzyme immunoassay for incidence estimation and surveillance Approved November 21 2006 (2).pdf [Internet]. [citado 16 de agosto de 2017]. Disponible en: [https://www.cdc.gov/globalAIDS/docs/surveillance/Interim%20Recommendations%20for%20the%20use%20of%20the%20BED%20capture%20enzyme%20immunoassay%20for%20incidence%20estimation%20and%20surveillance%20Approved%20November%2021%202006%20\(2\).pdf](https://www.cdc.gov/globalAIDS/docs/surveillance/Interim%20Recommendations%20for%20the%20use%20of%20the%20BED%20capture%20enzyme%20immunoassay%20for%20incidence%20estimation%20and%20surveillance%20Approved%20November%2021%202006%20(2).pdf)
110. Bravo-García E, Ortiz-Pérez H. [Analysis of HIV/AIDS mortality in Mexico from 1990 to 2013: An assessment of the feasibility of millennium development goals by 2015]. Gac Med Mex. diciembre de 2016;152(6):819-30.
111. CENSIDA. Boletín Salvar 23 _Diciembre 2103 [Internet]. 2013 [citado 1 de agosto de 2019]. Disponible en: <http://archive.org/details/BoletinSalvar23V2>
112. Life technologies. Real-time PCR handbook. Disponible en: <http://www.genequantification.com/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>; 2012.
113. Life technologies. Manual del curso teórico-práctico de PCR Tiempo Real y sus aplicaciones. Real-time PCR handbook. Disponible en <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>; 2014.
114. PrimeQ. Technical Note. Dissociation Curve Analysis. Disponible en: http://www.coleparmer.ca/Assets/MoreInfo/93948-00_PrimeQ_Dissociation_Curve_Analysis_Tech_Note.pdf; 2008.
115. Cousins MM, Donnell D, Eshleman SH. Impact of mutation type and amplicon characteristics on genetic diversity measures generated using a high-resolution melting diversity assay. J Mol Diagn JMD. enero de 2013;15(1):130-7.

116. Cousins MM, Swan D, Magaret CA, Hoover DR, Eshleman SH. Analysis of HIV using a high resolution melting (HRM) diversity assay: automation of HRM data analysis enhances the utility of the assay for analysis of HIV incidence. *PloS One*. 2012;7(12):e51359.
117. Chen I, Chau G, Wang J, Clarke W, Marzinke MA, Cummings V, et al. Analysis of HIV Diversity in HIV-Infected Black Men Who Have Sex with Men (HPTN 061). *PloS One*. 2016;11(12):e0167629.
118. Chen I, Khaki L, Lindsey JC, Fry C, Cousins MM, Siliciano RF, et al. Association of pol diversity with antiretroviral treatment outcomes among HIV-infected African children. *PloS One*. 2013;8(11):e81213.
119. James MM, Wang L, Musoke P, Donnell D, Fogel J, Towler WI, et al. Association of HIV diversity and survival in HIV-infected Ugandan infants. *PloS One*. 14 de abril de 2011;6(4):e18642.
120. ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo INTENDED USE_UCM216309.pdf [Internet]. [citado 17 de agosto de 2017]. Disponible en: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/.../UCM216309.p>
121. HIVAgAbCombo.pdf [Internet]. [citado 17 de agosto de 2017]. Disponible en: <http://www.illexmedical.com/files/PDF/HIVAgAbCombo.pdf>
122. BED_vs_Avidity_EG.pdf [Internet]. [citado 28 de marzo de 2018]. Disponible en: http://www.sediabio.com/resources/BED_vs_Avidity_EG.pdf
123. Karatzas-Delgado EF. Valores predictivos de pruebas serológicas para infecciones recientes de VIH [Tesis de Maestría en Ciencias en Enfermedades Infecciosas.]. [Cuernavaca, Morelos México.]: Escuela de Salud Pública de México, Instituto Nacional de Salud Pública.; 2016.
124. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33(7):1870-4.
125. Staden R. The Staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol*. junio de 1996;5(3):233-41.
126. staden_course.pdf [Internet]. [citado 1 de agosto de 2019]. Disponible en: https://bioinf.comav.upv.es/courses/intro_bioinf/_downloads/5521cd30ca085b97175a9d32ce58f517/staden_course.pdf
127. Dwight Z, Palais R, Wittwer CT. uMELT: prediction of high-resolution melting curves and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application. *Bioinforma Oxf Engl*. 1 de abril de 2011;27(7):1019-20.

128. R Development Core Team R. A language and environment for statistical computing. *Computing*. 1 de enero de 2006;1.
129. James MM, Wang L, Donnell D, Cousins MM, Barlow-Mosha L, Fogel JM, et al. Use of a High Resolution Melting Assay to Analyze HIV Diversity in HIV-infected Ugandan Children. *Pediatr Infect Dis J*. noviembre de 2012;31(11):e222-8.
130. Rozas J, Rozas R. DnaSP, DNA sequence polymorphism: an interactive program for estimating population genetics parameters from DNA sequence data. *Comput Appl Biosci CABIOS*. diciembre de 1995;11(6):621-5.
131. Kassanjee R, Pilcher CD, Busch MP, Murphy G, Facente SN, Keating SM, et al. Viral load criteria and threshold optimization to improve HIV incidence assay characteristics. *AIDS Lond Engl*. 24 de 2016;30(15):2361-71.
132. 180622_boston_meeting_report.pdf [Internet]. [citado 11 de agosto de 2019]. Disponible en: https://www.who.int/diagnostics_laboratory/links/180622_boston_meeting_report.pdf?ua=1
133. Hallett TB. Estimating the HIV incidence rate: recent and future developments. *Curr Opin HIV AIDS*. marzo de 2011;6(2):102-7.
134. Kassanjee R, McWalter TA, Bärnighausen T, Welte A. A new general biomarker-based incidence estimator. *Epidemiol Camb Mass*. septiembre de 2012;23(5):721-8.
135. Le Vu S, Velter A, Meyer L, Peytavin G, Guinard J, Pillonel J, et al. Biomarker-Based HIV Incidence in a Community Sample of Men Who Have Sex with Men in Paris, France. *PLoS ONE* [Internet]. 29 de junio de 2012 [citado 3 de abril de 2018];7(6). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3387238/>
136. Marcus U, Voss L, Kollan C, Hamouda O. HIV incidence increasing in MSM in Germany: factors influencing infection dynamics. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. septiembre de 2006;11(9):157-60.
137. Huerga H, Van Cutsem G, Ben Farhat J, Puren A, Bouhenia M, Wiesner L, et al. Progress towards the UNAIDS 90-90-90 goals by age and gender in a rural area of KwaZulu-Natal, South Africa: a household-based community cross-sectional survey. *BMC Public Health*. 02 de 2018;18(1):303.
138. 90–90–90 - An ambitious treatment target to help end the AIDS epidemic [Internet]. [citado 3 de abril de 2018]. Disponible en: <http://www.unaids.org/en/resources/documents/2017/90-90-90>

