



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**INCREMENTO DE RESISTENCIA PRETRATAMIENTO DE VIH EN TRES
ÁREAS GEOGRÁFICAS DE MÉXICO**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

P R E S E N T A

CLAUDIA GARCÍA MORALES

DIRECTOR DE TESIS

DR. GUSTAVO REYES TERÁN
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR

DR. VIANNEY FRANCISCO ORTIZ NAVARRETE
FACULTAD DE MEDICINA

DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en los Laboratorios del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI), perteneciente al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), de la ciudad de México.

Bajo la dirección del
Dr. Gustavo Reyes Terán

La asesoría de
Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete
Dr. Enrique Ortega Soto

Con la importante colaboración de
Dr. Santiago Ávila Ríos
QFB. Daniela Tapia Trejo
QC. Verónica Quiroz Morales

Y la contribución de
Dra. Maribel Soto Nava
MC. Marissa Pérez García
Dr. Humberto Valenzuela Ponce
Ing. Hector Esteban Paz Juárez

Esta investigación se desarrolló con el financiamiento de la Comisión de Salud y Comisión de Equidad de Género de la H. Cámara de Diputados.

Durante el período en que cursó el Doctorado en Ciencias Biomédicas, la C. Claudia García Morales, recibió beca del CONACYT.

Mis agradecimientos no son únicamente para las personas que contribuyeron directamente en este trabajo. También es importante agradecer a todas aquellas personas que contribuyeron indirectamente. Con ello, quiero mostrarles lo importantes que han sido en mi formación tanto académica como personal.

Primero, quiero agradecer a mi familia, mi papá Obdulio, a mis hermanos Margarita, Santiago Elías y Gregorio. Gracias a mi tía Bili, a todos mis tíos y primos de las familias García y Morales. En particular a mis primas Eloisa, Alejandra y Dulce.

Segundo, quiero agradecer, a todas aquellas personas que con su amistad han contribuido en mi persona: a mis amigos que permanecen, personas significativas y a los ahora Extraños, a lo que invitan algo tranquilo, a los que preguntan si ya voy a curar al bicho, a los que piden corona oscura, a los que me llevarán a la cima del Popo, a los que veo poco, a quienes escuchan o leen y dan consejos, a los de viaje. Todos ellos son especiales para mí.

Gracias a mis amigas de toda la vida Rubí, Karla, Citlalli y Paola que a pesar de la distancia, cada día están conmigo para darme consejos, para hacerme reír, para darme consejos y para compartir buenos y malos momentos conmigo. Ana, siempre has sido mi amiga más cercada y has compartido buenos, malos y peores momentos, gracias por ello.

Leslie, Omar, Lucio, Roberto, Elenae y Ángel, gracias por ser un gran apoyo para mí, por estar en todo momento, estoy muy agradecida de tenerlos. Peter, Lalo, Daniel muchas gracias también a Ustedes. Lalo, gracias por tus enseñanzas. Peter, después de tantos años seguimos juntos!, gracias por escucharme siempre. Cuauhtemoc, Gloria y Fernando, amigos que veo poco pero que siempre llevo en el corazón.

Gracias mis amigos y compañeros de laboratorio que cada día hacen muy ameno el trabajo y que cada día agradezco por el lugar de trabajo que tengo. Gracias a Dani T que no solo es una gran colaboradora, sino también una gran amiga y compañera de viaje. Gracias a Santiago, por guiarme académicamente y por mostrarme humanidad y humildad. Oli y Dani “Garrito”, todavía sigo buscando mi misión en la vida, aún sigo buscando, gracias por toda su ayuda y aportaciones diarias. Maribel, gracias por tu amistad y por todas las enseñanzas. Humberto, gracias por la diversión y el aprendizaje diario. Vero, gracias por tu amistad, consejos y buenos ratos. Gonzalo, gracias por los consejos. Esteban, no sé por qué soy así, pero gracias por facilitarme el trabajo cada día. Gracias a Marissa, Bere, Alma, Silvia, César, Celia, Sandra, Maggie, Ángel, Loana, Elvira por compartir cada día. Dani T, Vero, Dulce y Marissa, Gracias por todo el apoyo y el gran trabajo que hacen cada día. A quienes ahora ya no están, pero estuvieron, Lety, Thaly, Tania, Selma, Alfredo, Natalia, Cris, Gustavo e Israel.

CONTENIDO

	Pág
Resumen	v
I Introducción	
Epidemiología de la Infección por VIH	1
Genoma y estructura.	2
Ciclo replicación.	3
Variabilidad del VIH.	6
Historia natural de la infección por VIH	8
Tratamiento contra VIH	10
Historia del desarrollo del tratamiento contra VIH	12
Cobertura de tratamiento antirretroviral	14
Resistencia al tratamiento	16
Panorama de la resistencia pretratamiento	17
II Planteamiento del problema y Justificación	21
III Objetivos	
General	24
Específicos	24
IV Material y Métodos	
Población de estudio y consideraciones éticas	25
Conteo de CD4+ y carga viral en plasma	26
Secuenciación del gen <i>pol</i> VIH	26
Estimación de resistencia a fármacos	27
Determinación de infección reciente	28
Análisis filogenético	28
Análisis estadísticos	29
V Resultados	
Características clínicas y epidemiológicas de las poblaciones de estudio	30
Comparación de resistencia pretratamiento entre zonas geográficas	31
Patrón de mutaciones asociadas con resistencia a Antirretrovirales	33
Resistencia individual a los antirretrovirales y a los esquemas de tratamiento más usados en México	34
Incremento de resistencia pretratamiento en el tiempo	36
Prevalencia de resistencia pretratamiento en personas con infección reciente .	39
Transmisión de virus con resistencia a antirretrovirales	43
VI Discusión	50
VII Referencias	54

RESUMEN

Introducción: Varios países con bajos/medianos ingresos han reportado resistencia pretratamiento (PDR) a NNRTI por arriba de 10%. **Objetivo:** Estimar la resistencia pretratamiento en tres puntos focales de la epidemia de VIH en México en seguimiento a la encuesta representativa nacional que reportó altos niveles de PDR en México. **Pacientes y Métodos:** Muestras de individuos mexicanos mayores de 18 años, con VIH y sin tratamiento antirretroviral (TAR) previo que fueron reclutados de 2008 a 2016. Se obtuvieron secuencias del gen *pol* del VIH del plasma de 1,194 individuos de la Zona Metropolitana del Centro, 773 de Cancún y 668 de Tijuana. **Resultados:** Una proporción más alta de mujeres, menores niveles educativos y de empleo fueron observados en Tijuana ($p < 0.0001$, en todos los casos). De 2012 a 2016, la prevalencia de PDR a cualquier antirretroviral (ARV) fue 16.7% en la Zona Metropolitana, 14.4% en Tijuana y 14.9% en Cancún. La prevalencia de PDR a inhibidores no análogos de nucleósidos de la retrotranscriptasa (NNRTI) fue la más alta en las tres zonas (10.8%, 7.1%, y 9.6% respectivamente, $p > 0.05$). Se observó un incremento en el tiempo de prevalencia de PDR a NNRTI en la Zona Metropolitana ($p = 0.0045$) y Tijuana ($p = 0.0333$) en 2008-2016. Se observó un incremento de resistencia en el tiempo al antirretroviral efavirenz, un NNRTI, en las tres zonas ($p < 0.05$, en todos los casos), alcanzando 11.8% en la Zona Metropolitana, 6.1% en Tijuana y 8.3% en Cancún en 2016. El incremento de resistencia a efavirenz coincidió con el incremento en frecuencia de la mutación K103N ($p = 0.0069$ en la Zona Metropolitana, $p = 0.0278$ en Tijuana, no significativa en Cancún). **Conclusión:** El presente estudio sugiere escenarios de PDR diferentes en las tres diferentes zonas de la epidemia de VIH en México al mostrar niveles más bajos de resistencia a NNRTI en Tijuana comparado con la Zona Metropolitana del Centro y Cancún. Sin embargo, el incremento de resistencia en el tiempo a efavirenz y de la mutación K103N en las tres zonas sugiere la necesidad de una estrategia nacional en salud para responder a la resistencia del VIH previa al tratamiento.

PALABRAS CLAVE: PDR, NNRTI, EFV, Zona Metropolitana, Tijuana, Cancún.

I. INTRODUCCIÓN

Epidemiología de la Infección por VIH

Desde la identificación del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) como el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) en 1983,^{1, 2} la infección por VIH se ha reconocido como un grave problema de salud pública. Para finales de 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó cerca de 37 millones de personas viviendo con VIH (PVV) a nivel mundial,^{3, 4} sin embargo, únicamente el 70% (25.5 millones) de ellas conocía su status.^{3, 5} La Región Subsahariana es la zona más afectada por la infección por VIH con prevalencias superiores al 2% en población general adulta (Figura 1).^{4, 5} Para fines de 2016 la OMS reportó 1.8 millones de nuevas infecciones y un millón de muertes por enfermedades relacionadas a SIDA.^{3, 4}

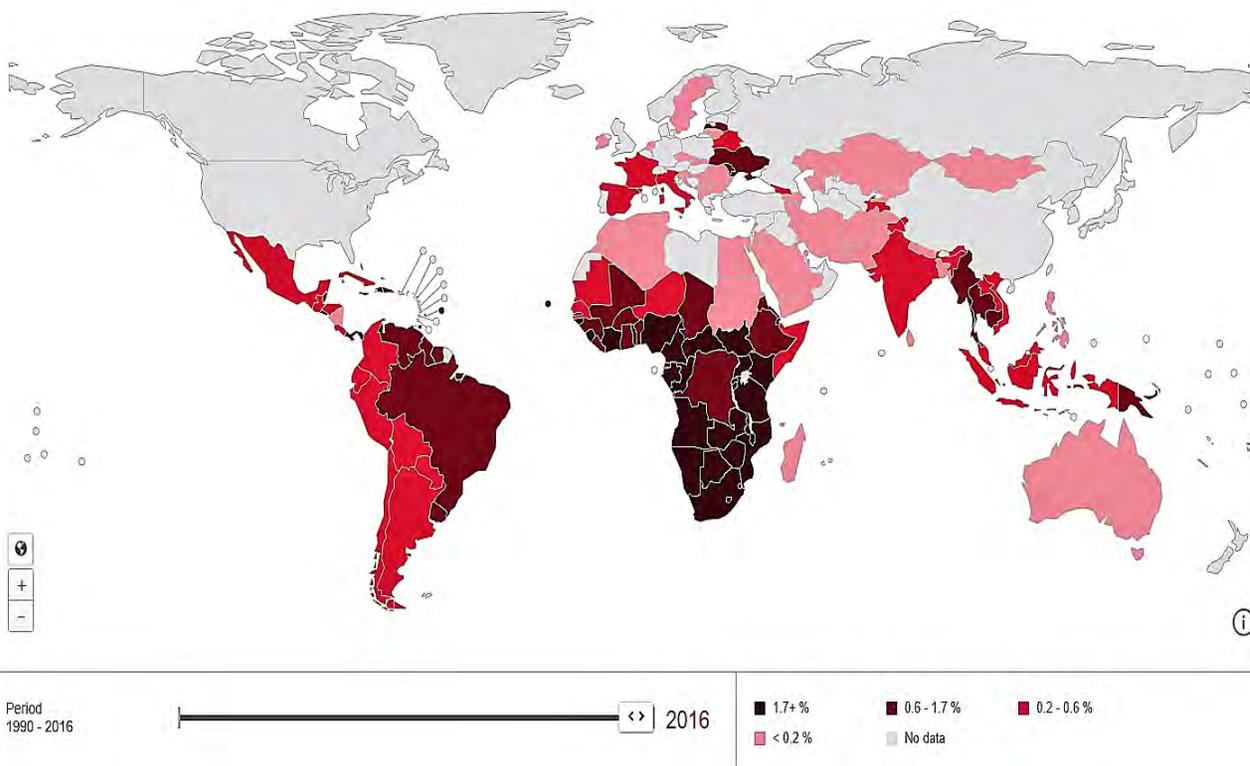


Figura 1: Prevalencia de la infección por VIH por nación en adultos de 15-49 años. La región más afectada es la región Subsahariana, el sur de Asia y el Pacífico, y Latinoamérica y el Caribe. La intensidad en los colores indica mayor prevalencia de infección por VIH en adultos. Tomado de <http://aidsinfo.unaids.org/>.⁵

En América, la OMS registró 3.3 millones de personas viviendo con VIH para fines de 2016, en particular, en la región de Latinoamérica y el Caribe registró 2.1 millones.³⁻⁵ En México, según datos oficiales del Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y el SIDA (CENSIDA), la

estimación de personas que viven con VIH fue de 210 mil a principios de 2017, de las cuales, cerca del 80% son hombres. Además, CENSIDA también reportó 11 mil nuevas infecciones y cerca de 5 mil defunciones en 2016⁶. La prevalencia nacional de VIH en México fue de 0.24% (Figura 1).⁵

Genoma y estructura del VIH

El VIH pertenece al género Lentivirus de la familia de los retrovirus,⁷ cuya principal célula blanco son los linfocitos T CD4+. El VIH es un virus esférico envuelto de 90-120 nm que obtiene su envoltura de la membrana plasmática de la célula hospedera.⁸

El genoma del VIH consta de dos copias de RNA (+) de cadena sencilla de aproximadamente 9.7 Kb. ^{7, 9} El genoma viral consiste en tres genes principales (*gag*, *pol* y *env*) y 6 genes reguladores/accesorios (*vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* y *nef*), flanqueados por una región no codificante (LTR, *long terminal repeat*) (Figura 2).^{8, 10} La región LTR es importante para la transcripción reversa e integración viral. Los tres genes principales son; *gag*, que codifica para proteínas estructurales de la cápside; *pol*, que codifica para las enzimas virales indispensables para el ciclo de replicación; y *env*, que codifica para proteínas que forman las espículas embebidas en la envoltura del virión.^{8, 11}

El gen *gag* codifica para las proteínas de matriz (MA, p17), de la cápside (CA, p24), de la nucleocápside (NC, p7) y p6. La proteína de matriz, forma una cubierta en la cara interna de la envoltura viral. La proteína de la cápside forma la cápside cónica, característica del VIH, que envuelve al genoma. La proteína de la nucleocápside forma complejos estables con el RNA viral para protegerlo. p6 es importante para la liberación del virus de la célula hospedera.^{7, 12}

El gen *pol* codifica para las enzimas virales: proteasa (PR, p10), transcriptasa reversa (RT, p51/p66) e integrasa (IN, p32). La RT es la enzima que lleva a cabo la transcripción reversa, primero sintetiza DNA a partir del RNA viral (actividad de transcriptasa reversa) y luego sintetiza la cadena complementaria de DNA (actividad de polimerasa de DNA). La integrasa inserta el DNA viral, sintetizado por la RT, en el genoma de la célula hospedera. La proteasa corta las poliproteínas virales para que adquieran sus propiedades funcionales. La proteasa es esencial para la maduración de las partículas virales. Estas tres enzimas, proteasa, transcriptasa reversa e integrasa, son blancos muy importantes para la terapia contra el VIH.^{9, 12}

El gen *env* codifica para las proteínas que forman las espículas embebidas en la envoltura: glicoproteína de superficie (SU, gp120) y proteína transmembranal (TM, gp41). La glicoproteína gp120 forma trímeros que interaccionan con los receptores y correceptores que permiten la entrada del virus a la célula hospedera. La proteína transmembrana es la responsable de fusionar la envoltura viral con la membrana de la célula hospedera para lograr una infección exitosa.^{8, 12}

El genoma del VIH también codifica para dos proteínas reguladoras para activar la transcripción viral (Tat, p15) y para controlar el splicing y exportar los transcritos virales del núcleo hacia el citoplasma (Rev, p19). Además, el genoma del VIH también codifica para proteínas accesorias (Vif, p23; Vpr, p15; Vpu, p16; y Nef, p27) con diversas funciones importantes para la patogénesis viral.¹³

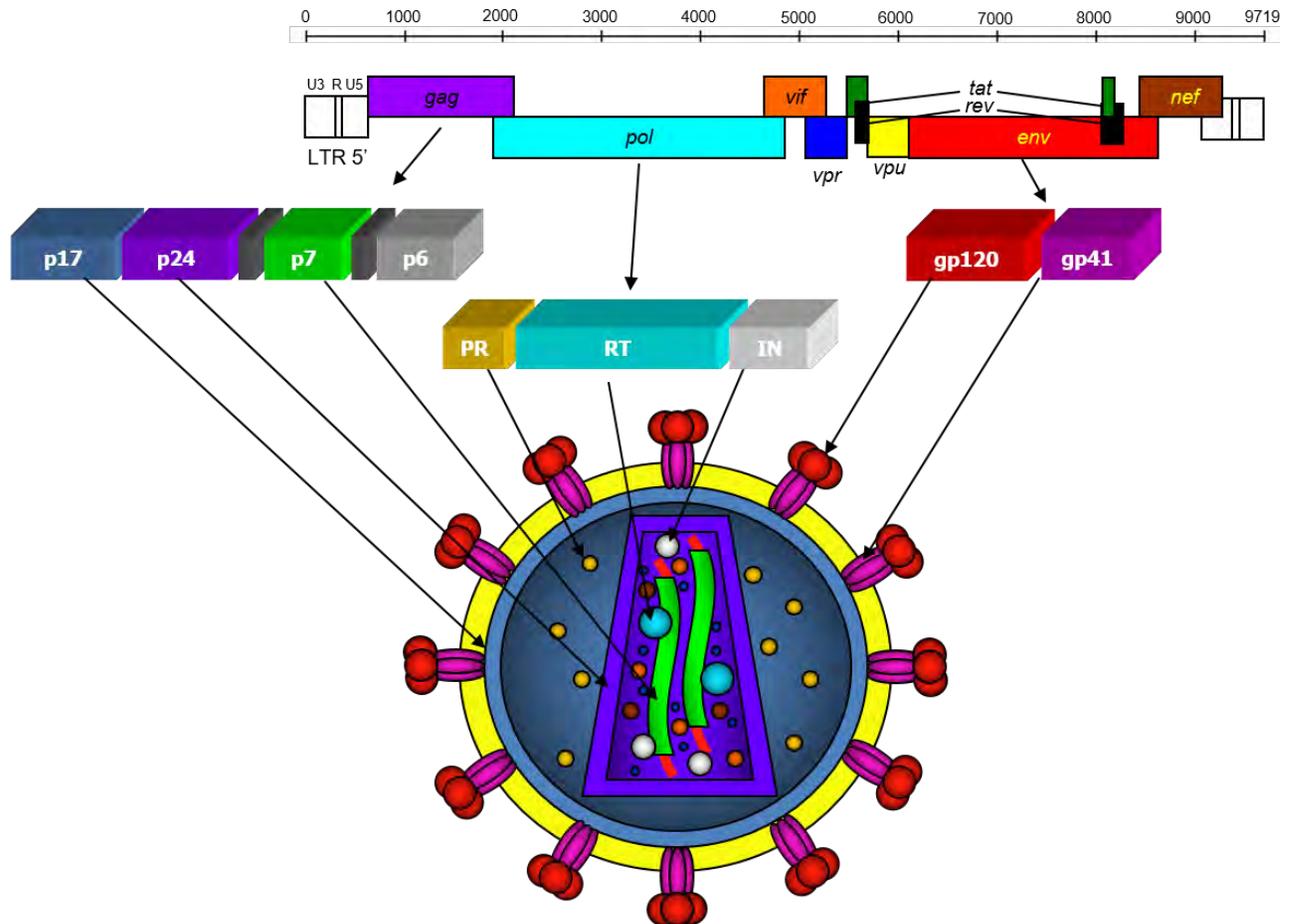


Figura 2. Organización del genoma y estructura del VIH. Se muestra la organización del genoma (parte superior), las proteínas producidas por los principales genes (*gag*, *pol* y *env*) (centro) y la estructura del virión (parte inferior). Modificado de Ávila-Ríos S, *et al* 2009.¹⁴

Ciclo replicación del VIH

El ciclo de replicación del VIH (figura 3) inicia cuando el virión se acerca y se fusiona con la membrana de la célula hospedera. Para este proceso, las glicoproteínas virales gp120 y gp41 tienen una función importante. Primero, gp120 se une al receptor celular CD4 y luego al correceptor CCR5 o CXCR4. Esto provoca cambios conformacionales que hacen que gp41 se exponga y pueda insertarse en la membrana de la célula hospedera, permitiendo la fusión de las membranas.^{15, 16}

Después de que se ha llevado a cabo la fusión, la cápside es liberada en el citoplasma de la célula hospedera. Luego, en un proceso dinámico, ocurre la descapsidación en la que intervienen proteínas virales y celulares.^{9, 17}

En el citoplasma, mientras ocurre la descapsidación, se lleva a cabo la transcripción reversa o retrotranscripción. La retrotranscripción es el proceso de síntesis de DNA a partir de RNA viral por acción de la enzima viral transcriptasa reversa o retrotranscriptasa (RT). Para el proceso de retrotranscripción, la RT primero sintetiza una cadena de DNA a partir del RNA viral (actividad de retrotranscriptasa); luego, la RT sintetiza la cadena complementaria de DNA (actividad de polimerasa de DNA) para obtener la doble hebra de DNA; por último, cuando el RNA viral ha sido copiado a DNA, la RT degrada este RNA.¹⁸ La actividad de la RT es uno de los principales blancos de la terapia antirretroviral.

El DNA sintetizado forma un complejo con proteínas (complejo de pre-integración), que incluye la integrasa, proteínas de la cápside y algunas proteínas celulares. Este complejo de pre-integración entra al núcleo con ayuda de varias nucleoporinas que forman el complejo del poro nuclear. Una vez que el DNA se encuentra dentro del núcleo, la integrasa lo integra al genoma celular. Para el proceso de integración, la integrasa se une directamente al DNA y procesa el extremo 3', es decir, remueve dos nucleótidos del extremo 3' para dejar extremos 3'-hidroxilo (3'-OH) libres. Después, la integrasa usa los grupos 3'-hidroxilo libres para atacar al DNA celular por el surco mayor. Este ataque deja un hueco en el extremo 5'-fosfato del DNA celular que le permite a la integrasa insertar el DNA viral. Finalmente, los espacios que quedan son reparados por la maquinaria celular. La integración se lleva a cabo preferencialmente en sitios con genes transcripcionalmente activos.^{9, 19, 20} La actividad de la integrasa, al igual que la RT, es también blanco de la terapia antirretroviral.

La transcripción del RNA viral se lleva a cabo en el núcleo, donde la participación la proteína Tat es muy importante para incrementar las tasas de transcritos. El RNA sintetizado puede servir directamente como mRNA para traducir proteínas o como RNA genómico viral. En cualquiera de los dos casos, el RNA viral es transportado hacia el citoplasma con ayuda de la proteína viral Rev. En el citoplasma se lleva a cabo la traducción a proteínas. Tanto la transcripción como la traducción se llevan a cabo de manera similar a la transcripción y traducción de proteínas celulares.^{21, 22}

Las proteínas virales son sintetizadas como precursores inmaduros en forma de polipéptidos. Estos polipéptidos virales y el RNA viral son transportados hacia la membrana celular donde el virión es ensamblado y liberado mediante gemación. Al momento de liberarse, el virus se lleva parte de la membrana plasmática de la célula que, junto con gp120 y gp41, conformarán la envoltura viral.²³

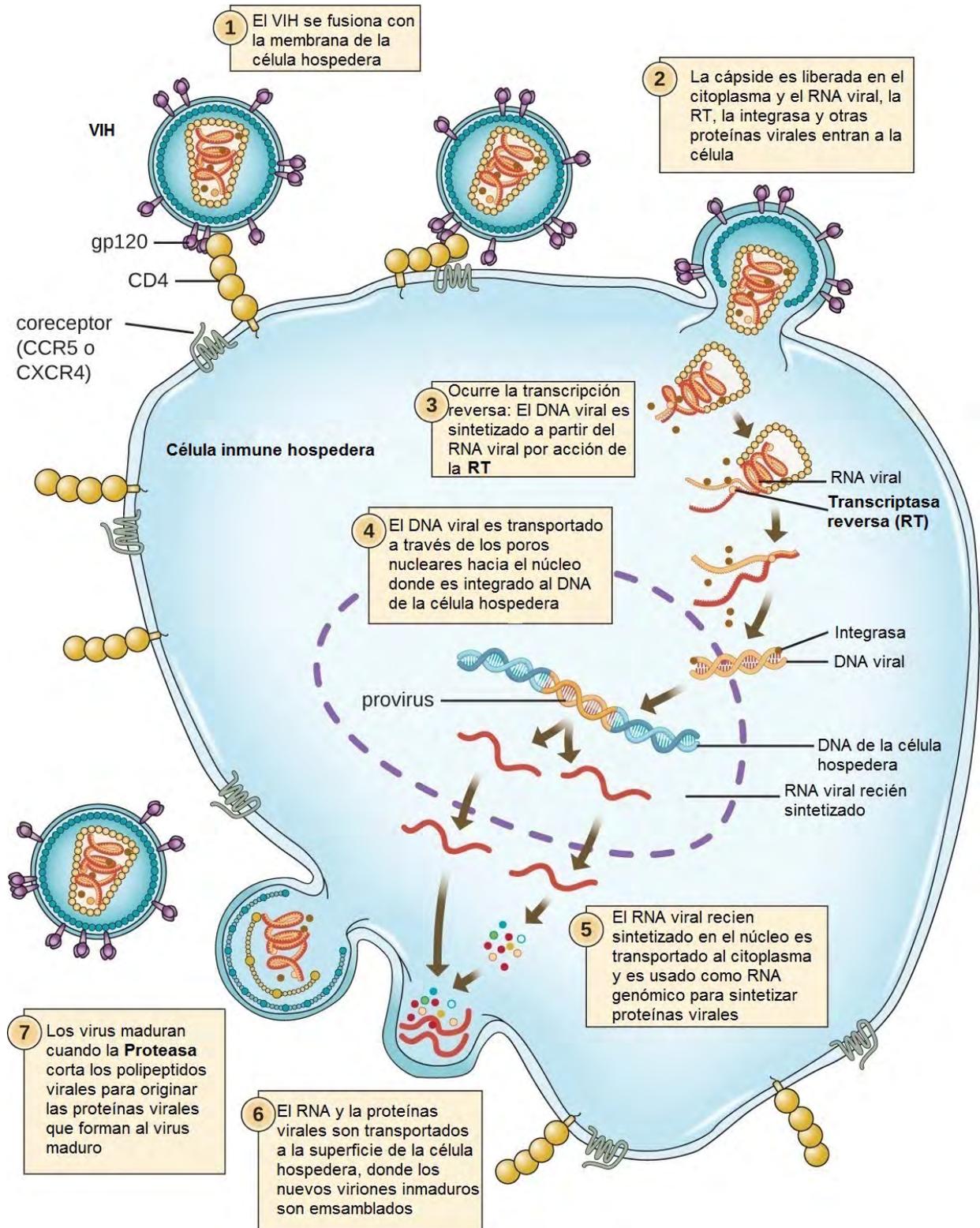


Figura 3. Ciclo de replicación del VIH. Se muestran enumeradas las etapas principales en el ciclo de replicación del VIH, iniciando con la fusión de membranas, seguida de la descapsidación, transcripción reversa, importación al núcleo, integración, síntesis de RNA viral y proteínas, ensamblaje del virión, liberación y maduración. Modificado de Pau AK *et al*, *Infect Dis Clin North Am* 2014. ²⁴

El virión que se libera de la célula hospedera no es infeccioso (inmaduro). Para lograr la maduración del virión la función de la proteasa es muy importante. La proteasa actúa sobre los precursores poliprotéicos de Gag-Pol (que contiene a MA, CA, NC, p6, PR, RT e IN) y Gag (que contiene a MA, CA, NC y p6). De esta manera las proteínas de la cápside y las enzimas adquieren sus funciones. El corte de los precursores poliprotéicos de Gag-Pol y Gag dan la forma cónica a la cápside, característica del VIH. ²³ Junto con la RT y la integrasa, la proteasa es otro de los principales blancos de la terapia antirretroviral.

Variabilidad del VIH

El VIH se caracteriza por ser uno de los virus más variables conocidos. La gran variabilidad del VIH es resultado, principalmente, de las altas tasa de replicación, de mutación y de recombinación del virus.²⁵ Se ha estimado que la tasa de replicación del VIH en una persona puede ser de hasta 10^9 viriones en un solo día. La alta tasa de mutaciones y de recombinación se debe a que la RT, que es la enzima que lleva a cabo la transcripción reversa (síntesis de DNA de doble cadena a partir de RNA de cadena sencilla), es muy propensa a cometer errores y carece de actividad de corrección.²⁶⁻²⁸ La retrotranscriptasa tiene baja fidelidad para incorporar nucleótidos durante el proceso de transcripción reversa, cometiendo de 1-10 errores por genoma en cada ciclo de replicación,^{9, 29} y generando no solo mutaciones puntuales sino también inserciones y deleciones en el genoma viral. Asimismo, la recombinación es otra fuente importante de la variabilidad del VIH, se ha estimado que puede haber de 3-9 eventos de recombinación por genoma en cada ciclo de replicación.³⁰

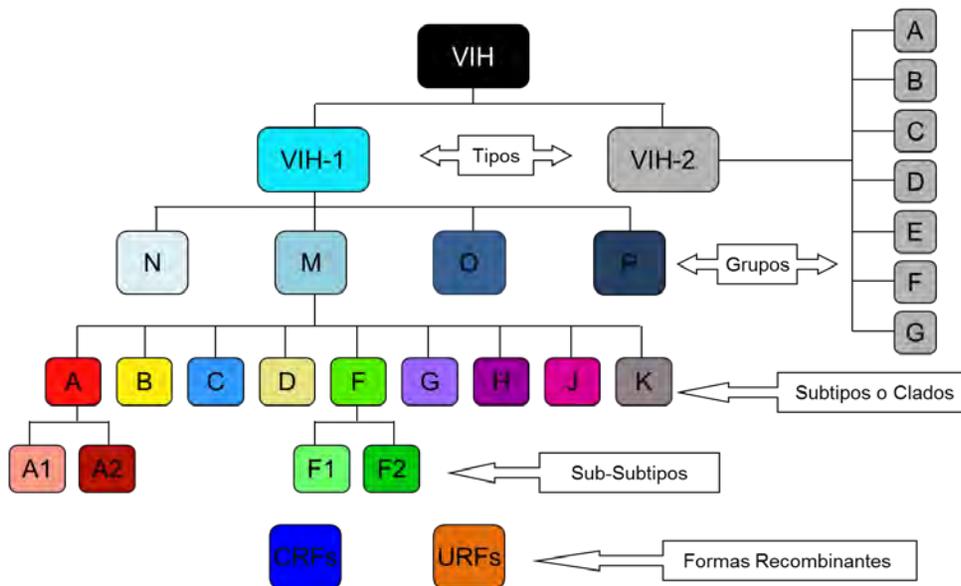


Figura 4. Clasificación del VIH en tipos, grupos, subtipos, sub-subtipos y formas recombinantes. Se muestran los dos tipos de VIH con sus respectivos grupos. Sólo se muestran los subtipos, sub-subtipos y formas recombinantes del VIH tipo I. CRF, forma recombinante circulante; URF, forma única recombinantes.

Su notable variabilidad permite al VIH evadir la respuesta inmune y la terapia antirretroviral, siendo esto un importante obstáculo para el control y erradicación de la epidemia.^{28, 31-33}

La gran variabilidad en el genoma del VIH ha originado la necesidad de clasificarlo en: tipos, grupos, subtipos, sub-subtipos, formas recombinantes circulantes (CRF, *circulating recombinant forms*) y formas únicas recombinantes (URF, *unique recombinant forms*) (Figura 4).

De los dos tipos, VIH-1 y VIH-2, el VIH-1 se encuentra diseminado en todo todas partes del mundo causando más del 95% de las infecciones a nivel mundial, mientras que al VIH-2 difícilmente se le encuentra fuera del Centro de África. La homología genética entre el VIH-1 y el VIH-2 es de 40-50%. El VIH-1 se divide en los grupos M, N, O y P. De ellos, el grupo M es el más diseminado causando más del 90% de las infecciones a nivel mundial. A su vez, el grupo M se divide en Subtipos. Estos subtipos tienen una diferencia genética entre ellos de 25-35% y se encuentran distribuidos de manera característica en las poblaciones, siendo el subtipo C el más prevalente (Figura 5) con casi el 50% de las infecciones mundiales, seguido del subtipo A y el B con poco más del 10% cada uno. El Subtipo B es el más prevalente en Europa y América.²⁶ En los últimos años se ha observado un incremento considerable de formas recombinantes circulantes y formas únicas recombinantes.²⁶

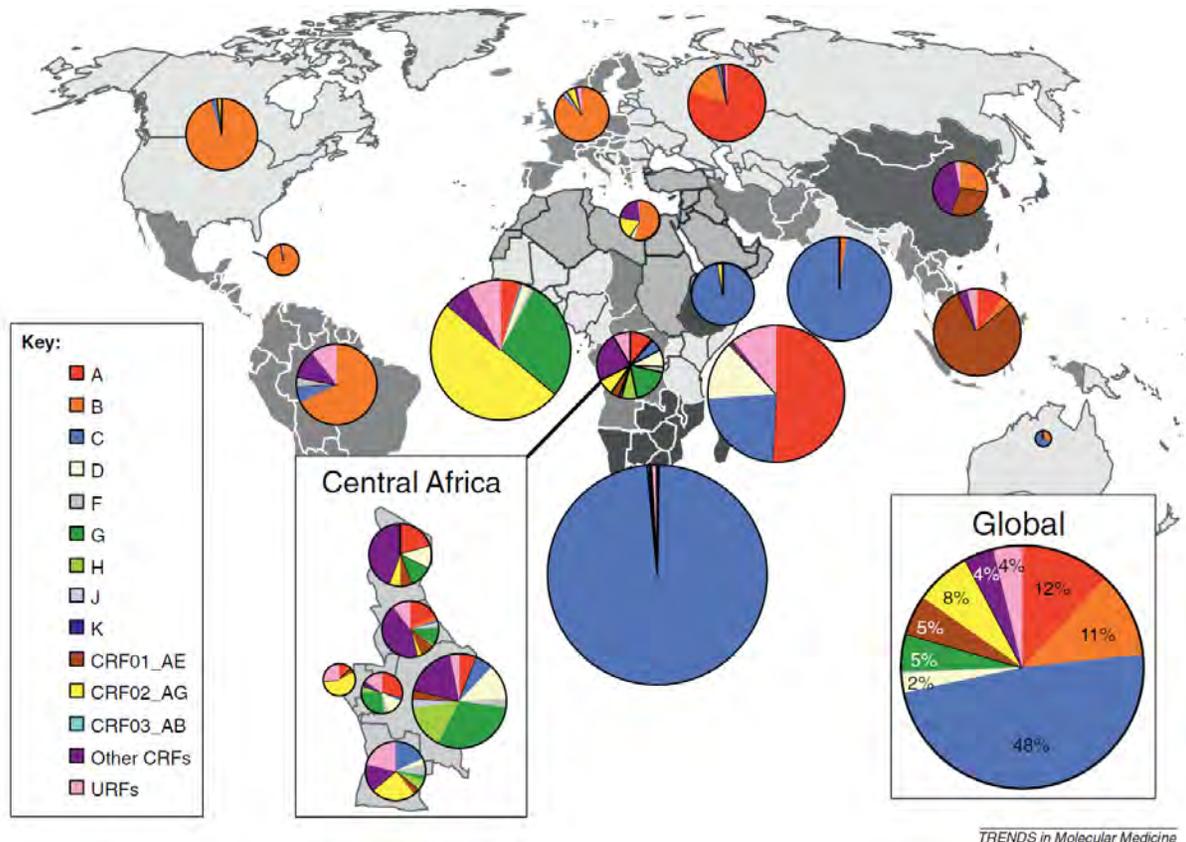


Figura 5. Distribución mundial de los subtipos del grupo M del VIH-1 y sus recombinantes. El tamaño de los pasteles representa el número relativo de personas que viven con VIH en la región. Tomado de Hemelaar J et al *Trends Mol Med* 2012.²⁶

Historia natural de la infección por VIH.

La historia natural típica de la infección por VIH, sin tratamiento antirretroviral (TAR), consta de 3 etapas: aguda, crónica y SIDA (Figura 6). Durante estas tres etapas, el VIH destruye el sistema inmune.

La etapa aguda tiene una duración de 3-6 meses, se caracteriza por una disminución drástica e irreversible en la cuenta de linfocitos T CD4+, principalmente en el intestino, y una replicación viral muy elevada (miles de millones de viriones por día).³⁴⁻³⁶ La alta tasa de replicación facilita la diseminación viral en todo el cuerpo y facilita la transmisión del virus a otros individuos. Durante la etapa aguda, el 40-90% de los individuos desarrollan síntomas parecidos a una gripe (fiebre, dolor de cabeza, dolor de garganta, fatiga, malestar general), también puede haber diarrea, salpullido entre otros, entre las 2 y 4 semanas. A este conjunto de síntomas se le conoce como síndrome retroviral agudo, que generalmente coincide con el pico máximo de viremia en plasma.³⁷ Después del pico máximo de viremia en plasma, la carga viral cae, debido a un control parcial por el sistema inmune, hasta un punto en el que se establece (set point viral). Este punto marca el inicio de la etapa crónica.

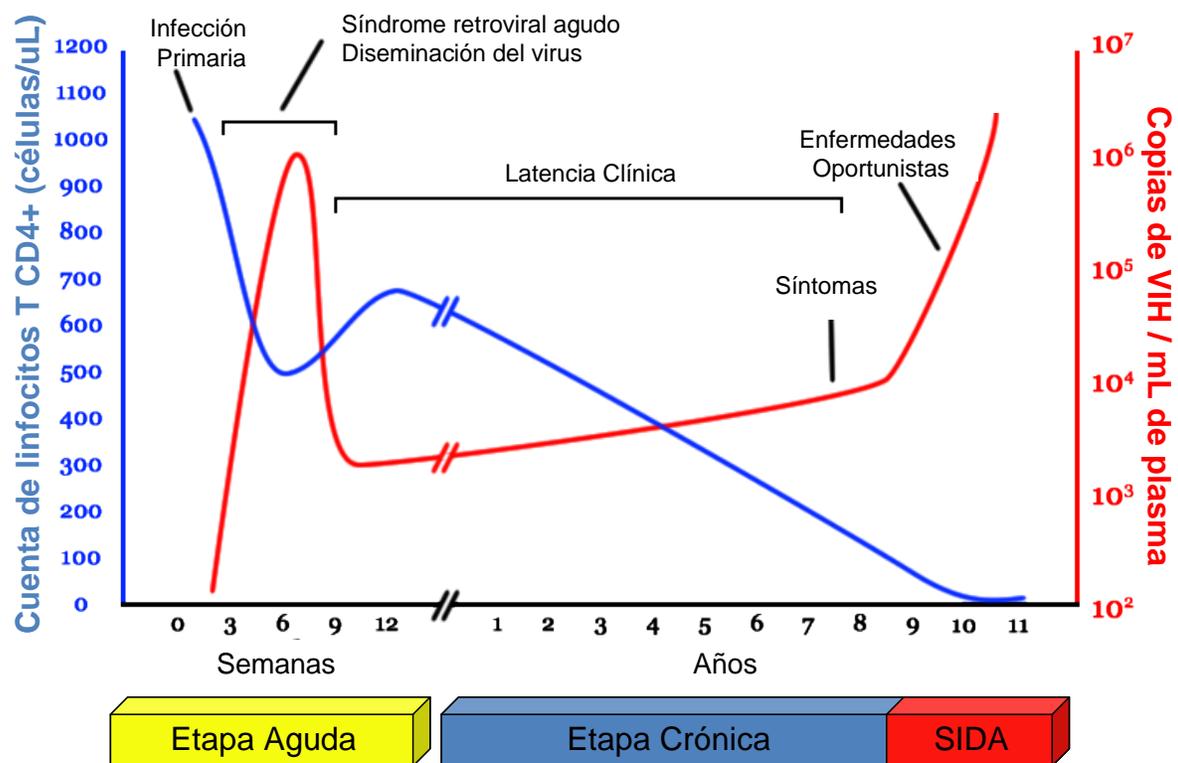


Figura 6. Historia natural de la infección por VIH. La historia natural de la infección por VIH consta de tres etapas: etapa aguda, crónica y SIDA, en base a dos parámetros clínicos, Conteo de linfocitos T CD4+ (línea azul) en sangre total y Carga viral (línea roja) en plasma. Imagen modificada de An *et al*, Trends Genet (2010).

La etapa crónica (latencia clínica) se caracteriza por replicación viral baja pero sostenida y disminución gradual e irreversible en la cuenta de linfocitos T CD4+ en sangre. Durante esta etapa, la mayoría de los individuos permanecen asintomáticos. La etapa crónica tiene una duración de 8-10 años en la mayoría de las personas con VIH.³⁴⁻³⁶

La etapa de SIDA es la etapa final de la infección, se caracteriza por replicación viral muy elevada y una depleción casi total de los linfocitos T CD4+ con conteos menores de 200 CD4/uL. Durante la etapa de SIDA aparecen múltiples enfermedades oportunistas y cánceres. Las principales enfermedades oportunistas reportadas son neumonía por *P. jiroveci*, tuberculosis, histoplasmosis, coccidiomicosis, toxoplasmosis, criptococosis, infecciones por virus herpes simple y citomegalovirus.³⁴⁻³⁶

Tratamiento contra VIH

EL tratamiento antirretroviral (TAR) ha modificado significativamente el curso natural de la infección por VIH al grado de haberla transformado de una enfermedad mortal a un padecimiento crónico controlable.³⁸ Sin embargo, el TAR no es capaz de restaurar por completo la salud, no es capaz de erradicar al virus del cuerpo ni de curar la infección y debe tomarse de por vida.

Los objetivos principales del tratamiento antirretroviral son: directamente suprimir la replicación viral hasta niveles clínicamente indetectables (menos de 40-50 copias de RNA viral por mL de plasma), restaurar el sistema inmune (incrementar la cuenta de linfocitos T CD4+), reducir las morbilidades asociadas a la infección para mejorar la calidad de vida de las personas con VIH, y reducir la transmisión de virus a otros individuos.^{19, 24, 39, 40}

Para tratar la infección por VIH se dispone de cinco clases de fármacos antirretrovirales (ARV) que actúan en diferentes puntos específicos y estratégicos del ciclo de replicación. Las clases de fármacos antirretrovirales son: inhibidores de la entrada (de fusión y antagonistas de CCR5), inhibidores análogos de nucleósidos de la RT (NRTI, *nucleoside reverse transcriptase inhibitors*), inhibidores no análogos de nucleósidos de la RT (NNRTI, *non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors*), inhibidores de integrasa de transferencia de cadena (INSTI, *integrase strand transfer inhibitors*) e inhibidores de proteasa (PI, *protease inhibitors*) (Figura 7).^{24, 41}

Los inhibidores de la entrada impiden la interacción del virus con las moléculas celulares o evitan la fusión de membranas. Maraviroc es un antagonista de CCR5 que evita que éste se una a gp120. Enfuvirtida es un polipéptido que se une a gp41 evitando que ésta sufra cambios conformacionales, de esta manera se evita la fusión de la membrana viral con la celular.^{19, 42}

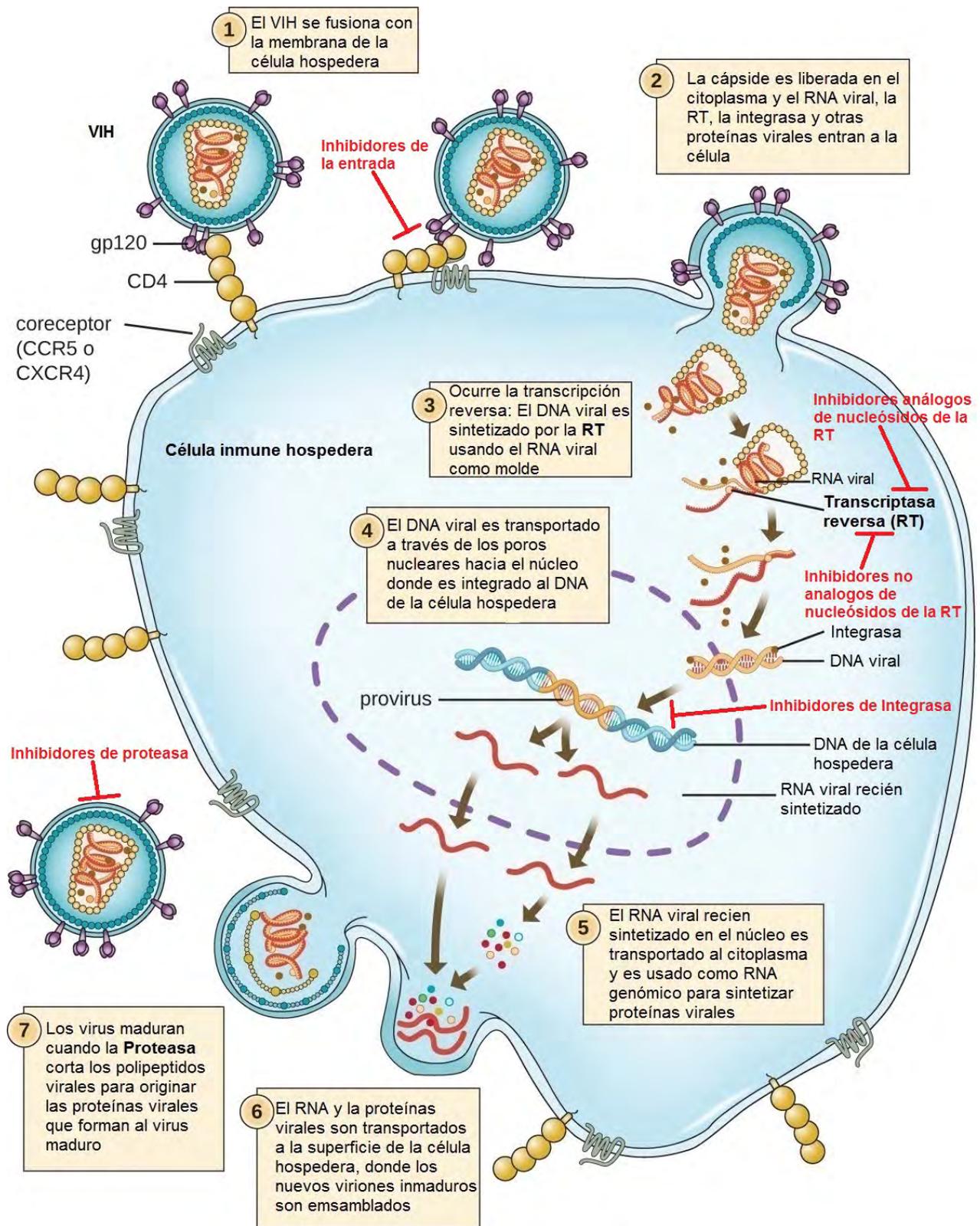


Figura 7: Ciclo de replicación del VIH y principales blancos terapéuticos. Los sitios en donde actúan las clases de antirretrovirales se muestran en **letras rojas**. Modificado de Pau AK *et al*, Infect Dis Clin North Am 2014²⁴

Los NRTIs son análogos a los nucleótidos o nucleósidos naturales que actúan como terminadores de cadena durante la transcripción reversa. Los NRTIs entran a la célula y son activados mediante fosforilación por enzimas celulares. De esta manera, los NRTIs compiten con los dNTPs naturales para ser incorporados en la cadena naciente de DNA. La elongación de la cadena de DNA es bloqueada porque los análogos de nucleósidos carecen de un 3'-OH en el anillo de ribosa, que es el sitio donde se agregan los dNTPs naturales, deteniendo así la elongación de la cadena.^{19, 42}

Los NNRTIs son pequeños compuestos hidrofóbicos que se unen a un sitio hidrofóbico adyacente al sitio activo de la transcriptasa. Esta unión modifica el sitio activo de la enzima disminuyendo o inhibiendo su actividad de polimerizar el DNA durante el proceso de retrotranscripción.^{19, 42}

Los INTSI se unen al sitio catalítico de la enzima inhibiéndola y evitando así la integrasa transfiera la cadena de DNA viral, sintetizado por el RT, al genoma de la célula hospedera.^{19, 42}

Los PIs son compuestos que actúan al final del ciclo de replicación al evitar la maduración de los viriones. Los PIs se unen al sitio activo de la proteasa. Esto provoca que la proteasa ya no pueda cortar las poliproteínas que darán origen a las proteínas estructurales de la cápside y a las enzimas virales.^{19, 42}

Historia del desarrollo del tratamiento contra VIH

Históricamente, la terapia antirretroviral inició como monoterapia con la aprobación del uso de zidovudina, un NRTI, por la FDA en 1987 (Figura 8), en individuos con enfermedad avanzada quienes prolongaron su sobrevivencia. Sin embargo, rápidamente empezaron a surgir virus resistentes a zidovudina.⁴³

Con la aprobación de nuevos NRTIs por la FDA, llegó la era de la terapia dual (1992-1996). Usando zidovudina combinada con didanosina o zalcitabina se observaron mejores resultados para incrementar los CD4+ y sobrevivencia que solo usando monoterapia. Sin embargo, estos resultados eran poco duraderos y a pesar del beneficio clínico, los efectos adversos seguían siendo un problema.^{19, 43} Cuando se incluyó lamivudina como base de la terapia dual, se observaron mejores resultados de tolerancia y la aparición de cepas resistentes fue más retardada. Sin embargo, agregando tres fármacos, no se observaron beneficios adicionales.

Para 1996, fue aprobado el uso de los NNRTIs y los PIs, que combinados con los NRTIs, mostraron mejores resultados, surgiendo así la Terapia Antirretroviral Altamente Activa (HAART, *highly active antiretroviral therapy*).^{19, 44} El uso de la terapia combinada demostró su superioridad para suprimir la replicación viral más rápido y por periodos más prolongados comparado con terapia dual y la aparición de virus resistentes fue todavía más retardada.⁴³

En los años siguientes, se siguió investigando con nuevos fármacos. En general, los nuevos fármacos fueron mejor tolerados y más potentes.^{43, 44} Asimismo, empezaron a estar disponibles combinaciones de fármacos, de la misma o diferente clase, en una sola pastilla (Figura 8). Esto mejoró considerablemente la adherencia al tratamiento antirretroviral, lo que se tradujo en una mayor esperanza de vida para las personas con VIH y disminución en la transmisión del virus.⁴³

Con el inicio de la terapia antirretroviral altamente activa, surgieron las primeras guías para el uso del tratamiento, apoyadas con la observación de que la triple terapia disminuía la mortalidad y morbilidad asociadas con la infección por VIH.⁴⁵ Sin embargo, la principal duda era cuándo era el mejor momento para iniciar tratamiento.

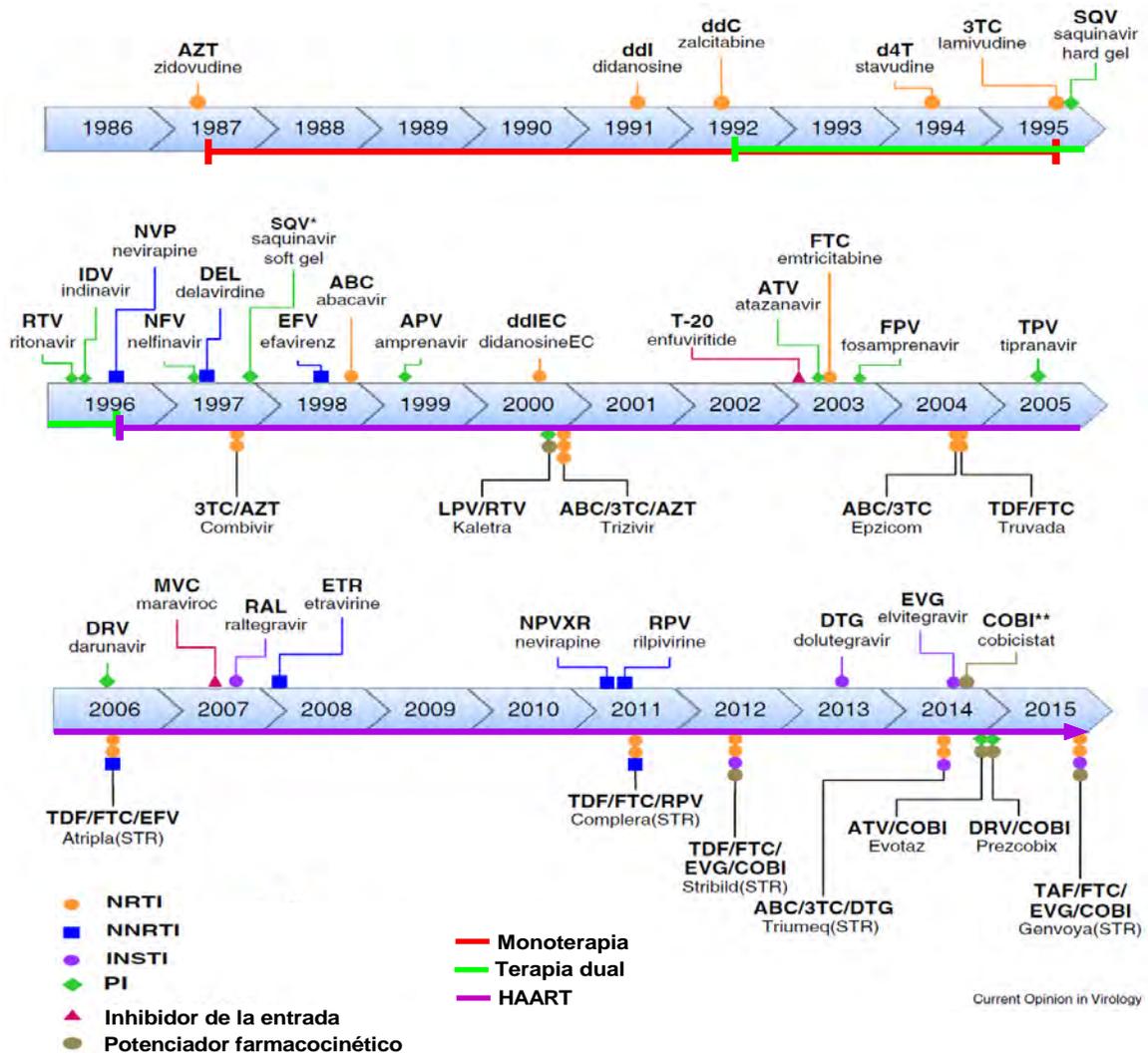


Figura 8: Línea del tiempo de la aprobación por la FDA de fármacos antirretrovirales y sus combinaciones. Se muestran las siglas y el nombre genérico del antirretroviral. NRTI, inhibidores análogos de nucleósidos de la RT; NNRTI, inhibidores no análogos de nucleósidos de la RT; INSTI, inhibidores de transferencia de la cadena de la Integrasa; PI, inhibidores de proteasa. Modificado de Cihlar T, *et al*, 2016.⁴⁴

Las primeras guías recomendaban iniciar tratamiento con conteos de CD4+ menores a 200 células/uL con el objetivo de evitar los efectos adversos de los fármacos. Sin embargo, varios estudios demostraron que iniciar tratamiento temprano se asociaba con mejores beneficios clínicos y mayor tiempo de supervivencia. Esto convirtió a la infección por VIH en una enfermedad crónica manejable.⁴³

Después, la OMS en sus guías recomendó iniciar tratamiento con conteos de CD4+ menores a 350 células, mientras que en los países industrializados se iniciaba tratamiento con conteos menores a 500 células/uL.⁴³

Actualmente, la recomendación de las guías de la OMS es iniciar tratamiento lo más pronto posible una vez hecho el diagnóstico, independientemente de la cuenta de CD4+.^{46, 47} Esta recomendación fue acuñada después de la observación de que el inicio temprano (CD4+>500) del tratamiento resultaba en una mejor recuperación clínica (recuperación de CD4+) para las personas con VIH, comparado con personas que iniciaban tarde (CD4+≤500) el tratamiento.^{48, 49}

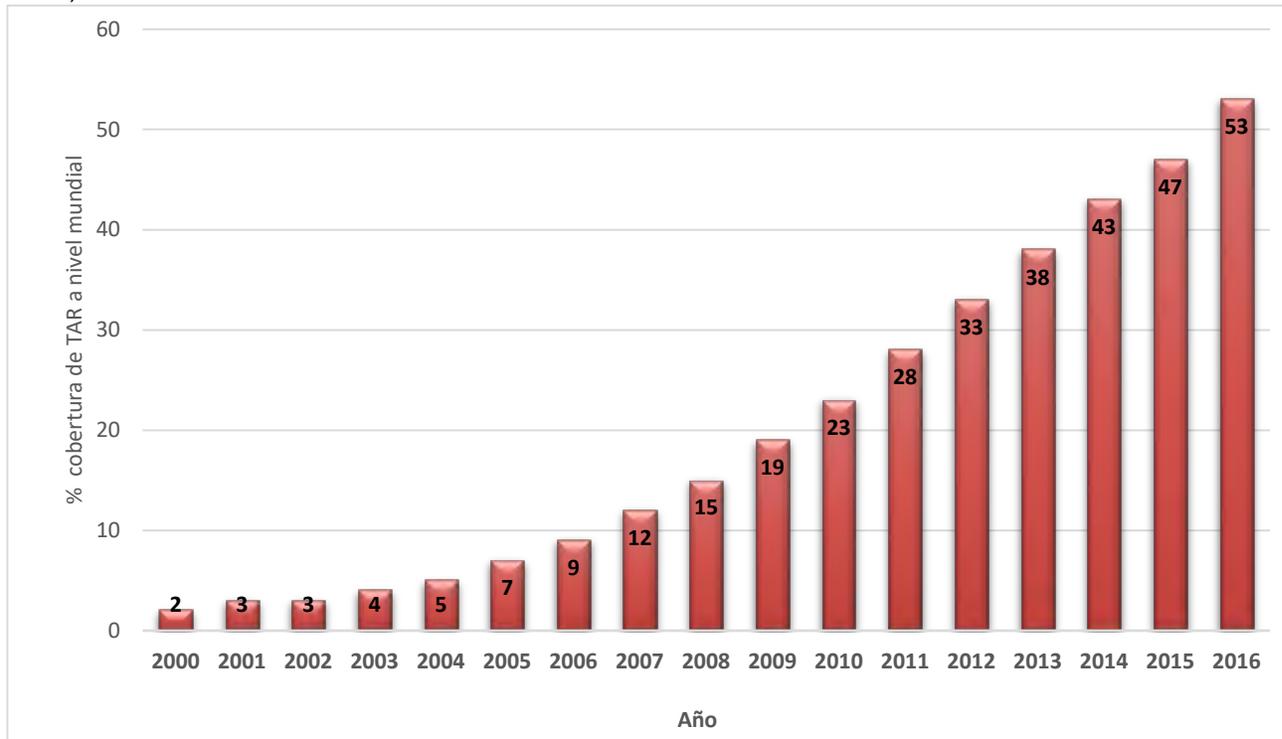
Cobertura de Tratamiento del VIH en personas con VIH

Como resultado de la respuesta global contra el VIH, en los últimos años se ha incrementado considerablemente la cantidad de personas que toman tratamiento antirretroviral (Figura 9). De los 37 millones de personas con VIH que estimó la OMS para fines de 2016, 19 millones estaban recibiendo terapia antirretroviral, cifra que equivale al 53% del total estimado de personas que viven con VIH (Figura 9a).^{3, 5, 50} Esta cifra se ha alcanzado gracias a que las guías de la OMS para el uso del tratamiento antirretroviral, recomiendan tratar a todas las personas con VIH, independientemente de su conteo de linfocitos T CD4+.^{46, 47, 51, 52}

En la región de América, el 66% (68 millones) de PVV estaban en tratamiento antirretroviral para 2016.⁴ En México, para finales de 2016 había cerca de 84 mil personas recibiendo tratamiento (aprox. 70% de las PVV) (Figura 9b), de los cuales cerca de 16 mil fueron nuevos iniciadores.⁶

La terapia para iniciar tratamiento recomendada por las guías de la OMS debe consistir en 2 NRTIs+ 1 NNRTI (o 1 INSTI). La combinación usada con mayor frecuencia es tenofovir+lamivudina (o emtricitabina)+efavirenz (TDF+3TC[o FTC]+EFV). TDF+FTC+EFV, mejor conocida comercialmente como Atripla (Figura 8) que está disponible en una sola pastilla al día, por lo que ayuda a una mejor adherencia al tratamiento. El esquema de tratamiento TDF+FTC+EFV es el más recomendado en los países con ingresos económicos intermedios y bajos.^{41, 46, 47, 51, 53}

a) Cobertura de Tratamiento Antirretroviral a nivel mundial



b) Cobertura de Tratamiento antirretroviral en México.



Figura 9: Cobertura de tratamiento antirretroviral. En el gráfico de cobertura a nivel mundial (a) se muestra el % anual de personas con tratamiento. En el gráfico de México (b) se muestra el número absoluto de personas con tratamiento en cada trimestre en la Secretaría de Salud. Tomado del Boletín de Censida 2017. ⁶

En México, el uso de esquemas basado en EFV se han incrementado en los últimos años. En la Secretaría de Salud, para 2016 el 80% de las personas iniciaron tratamiento antirretroviral con esquemas basados en EFV, 60% de las personas iniciaron tratamiento particularmente con TDF+FTC+EFV en régimen de una sola pastilla al día (Figura 10).⁵⁴

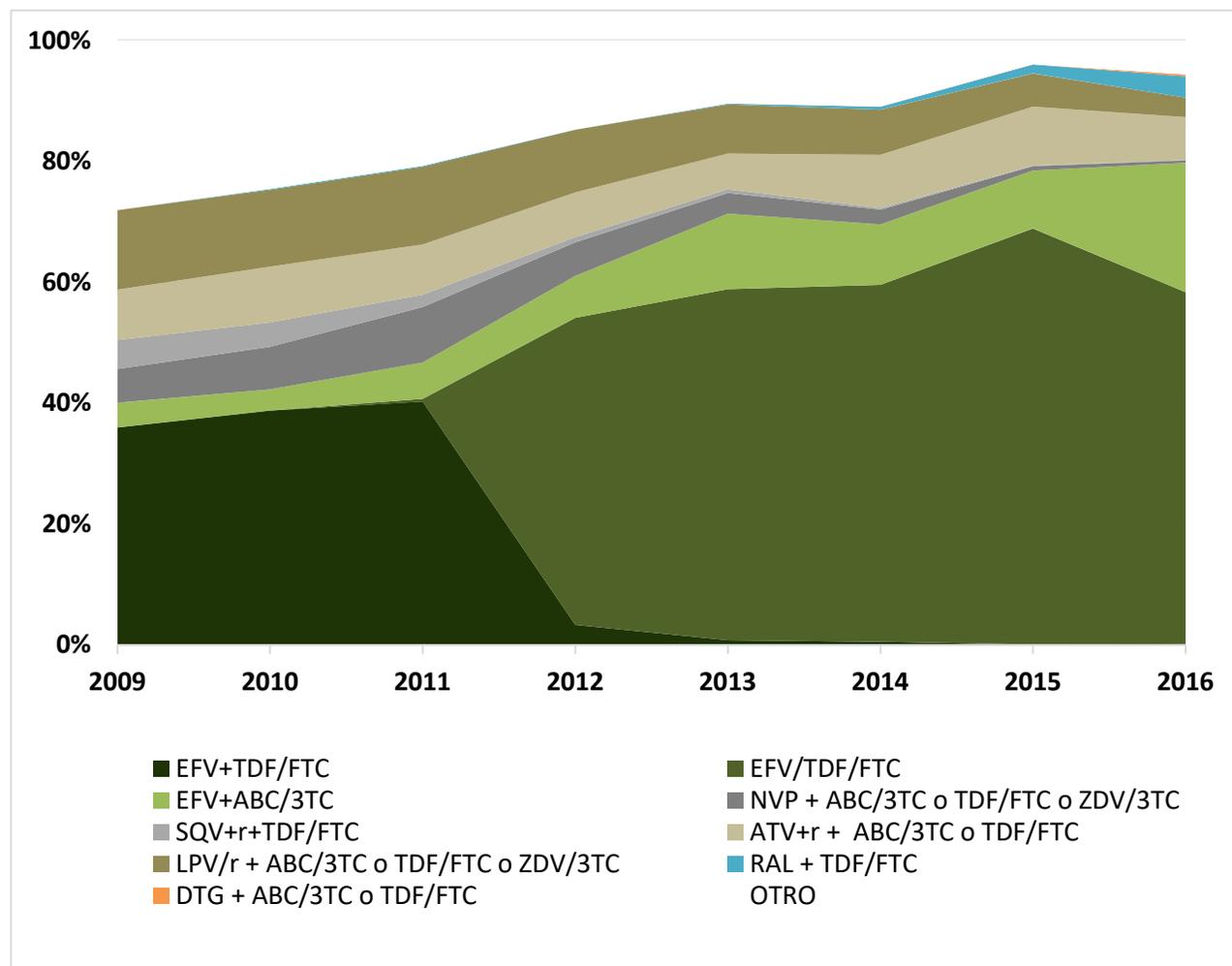


Figura 10. Esquemas de inicio de tratamiento de primera línea en México de 2009-2016 en la secretaría de salud. En el gráfico se muestran los esquemas de tratamiento de primera línea usados en los últimos años. Comunicación personal: Mtra Valenzuela-Lara M.

Resistencia al Tratamiento contra el VIH

Como ha sido demostrado en muchos estudios, el uso del tratamiento antirretroviral ha reducido significativamente la transmisión de virus, así como la morbilidad y mortalidad asociadas con VIH.^{45, 46, 55} Sin embargo, es bien sabido que la exposición al tratamiento puede inevitablemente incrementar el riesgo de que surjan, se transmitan y diseminen virus resistentes, principalmente cuando no hay buenas políticas de salud para responder a la resistencia del VIH a los antirretrovirales (HIVDR, *HIV drug resistance*).^{25, 56, 57}

La resistencia a los antirretrovirales es causada por cambios (mutaciones) que ocurren en el genoma del virus. Estas mutaciones pueden afectar la capacidad de los fármacos para inhibir la replicación viral. En general, cualquier fármaco está en riesgo de ser parcial o completamente inactivo frente a los virus resistentes, incluidos los fármacos nuevos.⁵⁸

La resistencia a los antirretrovirales se divide en tres principales categorías: resistencia adquirida (ADR, *acquired HIV drug resistance*), resistencia transmitida (TDR, *transmitted HIV drug resistance*) y resistencia pretratamiento (PDR, *pretreatment HIV drug resistance*). La resistencia adquirida se genera cuando las mutaciones surgen debido a la replicación viral, supresión virológica subóptima, en individuos que están en tratamiento. La resistencia transmitida generalmente es detectada en individuos que adquieren virus ya resistentes que pueden permanecer por largo tiempo.^{58, 59} La resistencia pretratamiento es detectada en individuos que inician tratamiento por primera vez o en individuos que reinician tratamiento con esquemas de primera elección, después de haber dejado el tratamiento.^{52, 58, 60} Por tanto, la resistencia pretratamiento puede incluir tanto resistencia transmitida como resistencia adquirida.⁵⁸

Panorama de la resistencia pretratamiento del VIH

La resistencia pretratamiento puede incrementar el riesgo de fallo temprano al tratamiento de primera vez, por lo que la vigilancia de resistencia del VIH en poblaciones que inician tratamiento es ahora una fuerte recomendación de la OMS, principalmente en países con recursos económicos limitados.⁴⁶

Varios estudios han evidenciado alta prevalencia de resistencia pretratamiento a cualquier antirretroviral (7.3%-19.4%), principalmente asociado con resistencia a inhibidores no análogos de la RT(4.9%-11.3%).⁶¹⁻⁶⁷ Además, varios meta-análisis globales y regionales también han demostrado incremento de resistencia pretratamiento en el tiempo, debido principalmente al incremento de resistencia a inhibidores no análogos de la RT en todas las regiones del mundo, incluida la región de Latinoamérica y el Caribe (Figura 11).⁶⁸⁻⁷²

Adicionalmente, en 2014-2016 se han llevado a cabo encuestas con representatividad nacional en algunos países del mundo (Figura 12a). Estas encuestas se realizaron siguiendo las metodologías recomendadas por la OMS para la vigilancia de resistencia del VIH a los antirretrovirales.⁶⁰ En la región Latinoamericana, seis países han realizado encuestas con representatividad nacional: México, Guatemala, Nicaragua, Colombia, Brasil y Argentina.⁵⁸ En estas encuestas, Nicaragua, Guatemala y Argentina, han documentado resistencia pretratamiento de VIH a inhibidores no análogos de la RT por arriba de 10% (Figura 12b).^{58, 73, 74} Mientras que para México la OMS ha reportado 9.2% de prevalencia de resistencia de HIV a los no análogos, exclusivamente en personas sin exposición previa al tratamiento.⁵⁸

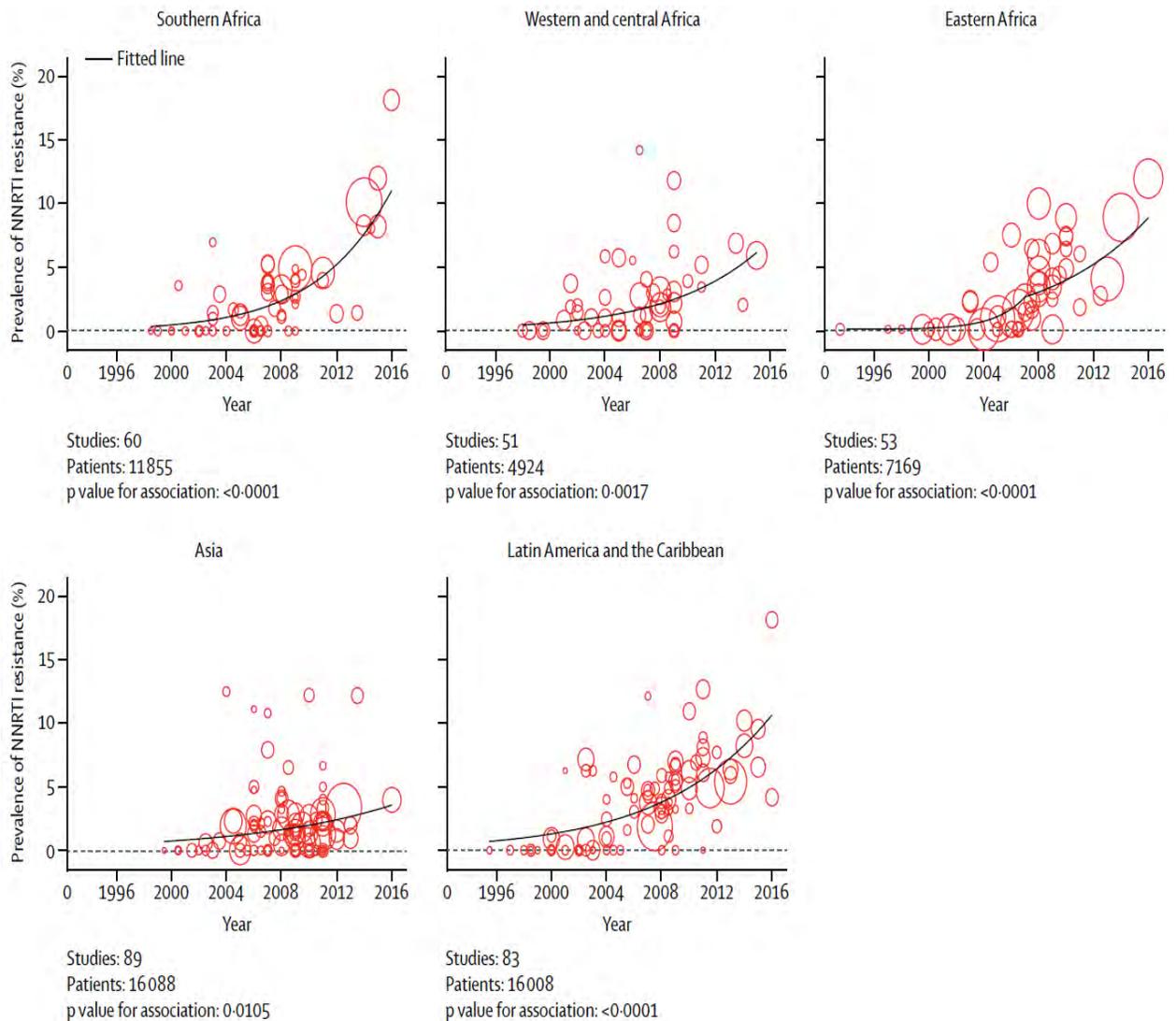
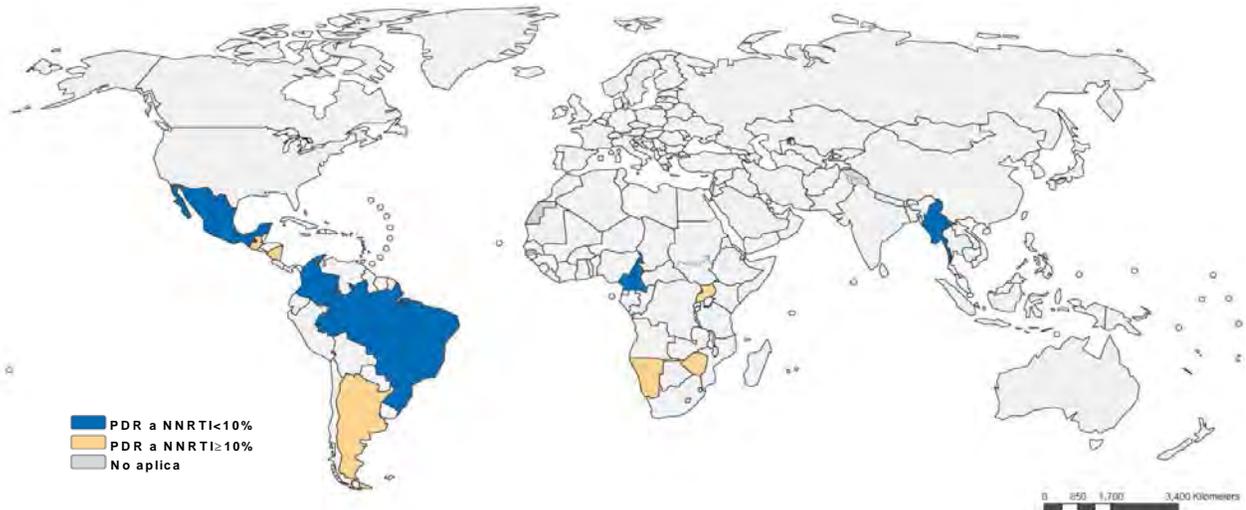


Figura 11: Incremento temporal de resistencia pretratamiento a NNRTI en diversas regiones del mundo. Los círculos rojos en las gráficas representan la cantidad de personas que se incluyeron en los análisis; la línea negra representa la tendencia. Tomado de Gupta *et al*/Lancet ID 2017 y HIV Drug Resistance Report 2017 de la OMS.^{58, 72}

En México en 2015, de febrero a julio, se realizó la primera encuesta con representatividad nacional siguiendo las metodologías establecidas por la OMS.⁶⁰ Para esta encuesta se seleccionaron aleatoriamente 25 clínicas de las cuales se obtuvieron muestras de 288 pacientes sin tratamiento antirretroviral previo para evaluar la resistencia pretratamiento (Figura 13). La mayoría de las personas con resistencia pretratamiento se encontraban con infección muy avanzada (176 mediana de CD4+).⁵⁴

a) Países que implementaron encuestas en 2014-2016



b) Niveles de PDR a NNRTI

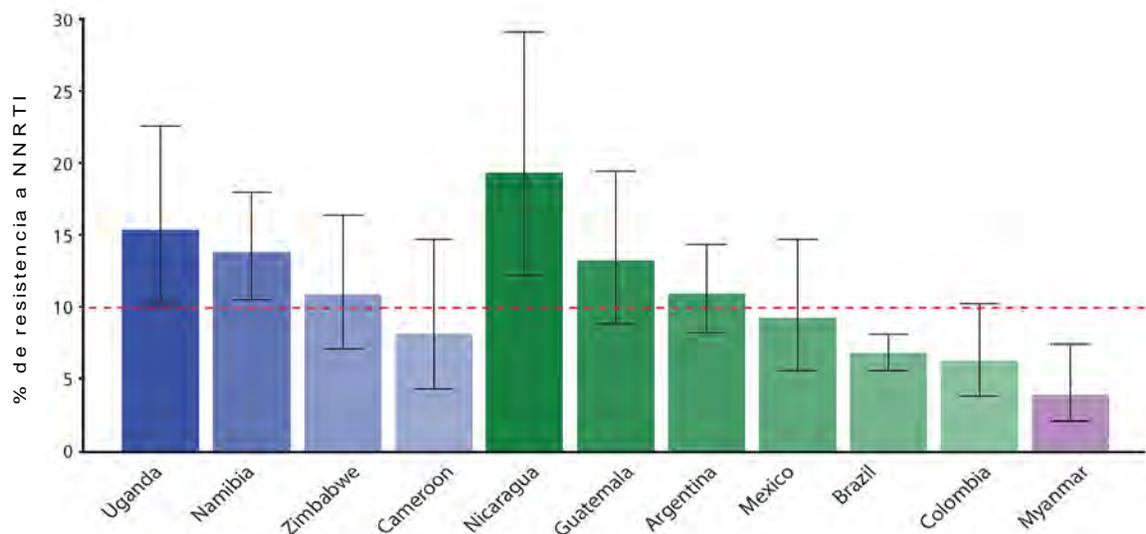


Figura 12: Países que implementaron encuestas con representatividad nacional para vigilancia de PDR en 2014-2016 (a) y niveles de PDR a NNRTI por País (b). En la gráfica (b) las barras azules corresponden a países africanos, las barras verdes corresponden a países latinoamericanos y el morado al único país asiático que realizó su encuesta con representatividad nacional entre 2014-2016. Tomado de HIV Drug Resistance Report 2017 de la OMS.⁵⁸

Los resultados de 260 secuencias virales fueron incluidas en el Reporte de 2017 de Resistencia. El 83% (221/260) de las secuencias pertenecían a hombres con mediana de edad de 32.9 años, quienes en su mayoría (82.6%), posteriormente iniciaron tratamiento ARV con esquemas basados en inhibidores no análogos de la RT. La resistencia pretratamiento en personas sin tratamiento previo fue de 13.5%, siendo los inhibidores no análogos de la RT la clase de fármacos más afectada (9.2%), seguido de análogos de nucleósidos de la RT (5.5%) e inhibidores de proteasa (2.6%).⁵⁸



Figura 13: Distribución geográfica de las 25 clínicas participantes en la encuesta con representatividad nacional para resistencia pretratamiento. Se muestra la cantidad de muestras con la que contribuyó cada clínica seleccionada. CAPASITS, Centro Ambulatorio para la Prevención y Atención en VIH SIDA e Infecciones de Transmisión Sexual. Tomado de Avila-Ríos *et al*, Lancet HIV 2016.⁵⁴

Los resultados preliminares de la encuesta nacional de vigilancia de Resistencia pretratamiento en México,⁵⁴ fueron presentados ante CENSIDA. Con la observación de que en México existen disparidades en los programas estatales en diferentes partes de México,^{6, 75, 76} CENSIDA sugirió obtener datos, al menos, a nivel regional (sub-nacional). Sin embargo, realizar encuestas subregionales requieren mucha planeación logística, recursos materiales, monetarios y humanos. Como un primer acercamiento para evaluar diferencias regionales de resistencia en el país, se llevó a cabo este estudio en el que se evaluó retrospectivamente la prevalencia de resistencia pretratamiento, así como su incremento en el tiempo en tres zonas geográficas de México: Tijuana, Zona Metropolitana del Centro y Cancún.

II. PLATEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

PLANTEAMIENTO

¿La prevalencia de resistencia pretratamiento del VIH, así como su tendencia de cambio en el tiempo es diferente en las diferentes regiones de México?

JUSTIFICACIÓN

El uso del tratamiento antirretroviral ha reducido significativamente la transmisión de virus, así como la morbilidad y mortalidad asociadas con VIH. Sin embargo, la exposición al tratamiento puede inevitablemente incrementar el riesgo de que surjan, se transmitan y diseminen virus resistentes. Por lo que la vigilancia de la resistencia debe ser parte de las políticas de salud para responder a la resistencia del VIH a los antirretrovirales.

En los últimos años, a nivel mundial, se ha incrementado la cobertura al tratamiento antirretroviral. Luego de la observación de que el inicio del tratamiento en etapas más tempranas de la infección permite una mejor recuperación clínica (cuenta de CD4+),⁴⁸ la OMS recomienda iniciar tratamiento lo más pronto posible, una vez hecho el diagnóstico de VIH, sin importar la cuenta de linfocitos T CD4+.⁴⁶ En personas que inician tratamiento, la OMS ha recomendado el uso de esquemas basados en inhibidores no análogos de nucleósidos de la RT, efavirenz específicamente. Siguiendo esta recomendación, los esquemas de tratamiento basados en no análogos de nucleósidos son ampliamente usados en países con bajos/medianos ingresos económicos, incluyendo países latinoamericanos y entre ellos, México.^{46, 53, 77}

El incremento en cobertura al tratamiento ha tenido como consecuencia el incremento de resistencia pretratamiento del VIH a los antirretrovirales. Sin embargo, las pruebas para detectar resistencia del VIH a los antirretrovirales no son ampliamente recomendadas en las guías de tratamiento antirretroviral y no están disponibles en la mayoría de los países, por lo tanto, las personas con virus resistentes podrían no ser identificadas y podrían no recibir el esquema de tratamiento más efectivo para ellos, pudiendo esto llevar a la transmisión y diseminación de las cepas virales resistentes.

Los altos niveles de resistencia a inhibidores no análogos de la RT observados en diversos estudios ponen en riesgo los planes de control mundial del VIH para 2030.⁷⁸ La OMS, a través de su Plan Global de Acción contra Farmacorresistencia del VIH en 2017, recomienda el cambio a esquemas

de primera línea basados en INSTI cuando los niveles de resistencia a inhibidores no análogos de la RT son mayores a 10%.⁷⁹

El Programa Nacional de VIH en México está actualmente analizando opciones para implementar una estrategia de salud pública nacional para responder a los altos niveles de resistencia, cercanos al 10% para inhibidores no análogos de la RT, observados en la encuesta con representatividad nacional realizada en 2015. Entre estas opciones se encuentran: sustituir los esquemas de tratamiento basados en efavirenz por esquemas basados en dolutegravir y hacer genotipo a todas las personas antes de que inicien tratamiento antirretroviral.

Sin embargo, debido a los elevados costos de los antirretrovirales, licencias y políticas administrativas, hacer sustitución de esquemas de tratamiento, sigue siendo un reto para el Programa Nacional en México. Por otra parte, México es un país grande y complejo, con miles de personas iniciando tratamiento anualmente, por lo que hacer genotipo a todas las personas que inician tratamiento todavía no es una política recomendada a nivel nacional debido a la escasez de recursos.

Una alternativa para apoyar en la toma de decisiones de salud respecto a VIH en el país puede ser evaluar si existen diferencias en prevalencia de resistencia pretratamiento e incremento en el tiempo en zonas específicas del país. Como un primer acercamiento para observar diferencias en resistencia en diferentes regiones del país y en seguimiento a la encuesta con representatividad nacional de 2015, se realizó este estudio retrospectivo en el que se evaluó la resistencia pretratamiento y su incremento en el tiempo en tres puntos específicos (denominados aquí como zonas) críticos para la epidemia de VIH en México: La Zona Metropolitana del Centro, Tijuana y Cancún.

Tijuana, una ciudad en la frontera con EUA localizada en Baja California, estado del noroeste, caracterizada por una epidemia mezclada con varias poblaciones y situaciones de riesgo. Las poblaciones de riesgo en Tijuana incluyen: hombres que tienen sexo con hombres, usuarios de drogas inyectadas, trabajadores sexuales, extranjeros y mexicanos que pagan por sexo con mexicanos, migrantes mexicanos y centroamericanos. Mientras, las situaciones riesgo incluyen: pobreza y marginalización, discriminación y violencia.⁸⁰⁻⁸³ Cancún, localizada en Quintana Roo, estado del sureste, es conocido por ser un centro turístico con la epidemia de VIH influenciada por turismo sexual e incremento de conductas de riesgo que resultan en una alta prevalencia de VIH comparado con la media nacional.^{75, 84} La Zona Metropolitana, incluyendo la Ciudad de México y los suburbios, contiene el 25% de personas con VIH de todo el país,⁸⁴ y refleja la epidemia concentrada característica de México, que afecta especialmente a hombres que tienen sexo con hombres, hombre y mujeres trabajadores sexuales y personas transgénero. Por otra parte, en 2016 Baja

California y Quintana Roo, estuvieron entre los 5 estados con la proporción más baja de personas que lograron supresión viral (74% y 77%, respectivamente). Ambos estados también mostraron estar bajo la media nacional en retención en tratamiento a los 12 meses (84%, ambos) y cobertura de carga viral (70% y 68%, respectivamente).⁷⁶

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la prevalencia de resistencia pretratamiento del VIH a las diferentes clases de fármacos antirretrovirales, así como sus tendencias en el tiempo en tres zonas geográficas de México

Objetivos específicos

1. Determinar la prevalencia de resistencia pretratamiento del VIH a las diferentes clases de fármacos antirretrovirales en tres zonas geográficas de México
2. Identificar las mutaciones asociadas con resistencia más prevalentes en las tres zonas geográficas
3. Estimar la resistencia pretratamiento a los antirretrovirales y a los esquemas de tratamiento más usados en México
4. Determinar las tendencias en el tiempo de la resistencia pretratamiento en las tres zonas geográficas
5. Determinar las tendencias en el tiempo de la resistencia pretratamiento a los antirretrovirales y a los esquemas de tratamiento más usados en México
6. Determinar prevalencia de resistencia pretratamiento en individuos con infección reciente o establecida
7. Identificar las redes de trasmisión de virus resistentes en las tres zonas geográficas

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio y consideraciones éticas

Se condujo un estudio transversal retrospectivo en 2,948 individuos mexicanos VIH+ vírgenes al tratamiento antirretroviral, mayores de 18 años procedentes de las siguientes tres zonas geográficas: La Zona Metropolitana (del Centro) (n=1,285), Tijuana (n=743) y Cancún (n=920) (Figura 14). Los individuos de Tijuana fueron reclutados en el Hospital General de Tijuana, Baja California. Los individuos de Cancún se reclutaron en el Centro Ambulatorio para la Prevención y Atención en SIDA e Infecciones de Transmisión Sexual (CAPASITS). Los individuos de la Zona Metropolitana fueron reclutados tanto en la Ciudad de México como en el Estado de México, incluyendo: la Clínica Especializada Condesa, el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), el Hospital General y el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición en la Ciudad de México; y los CAPASITS Nezahualcoyotl, Tlalnepantla y Ecatepec en el estado de México.

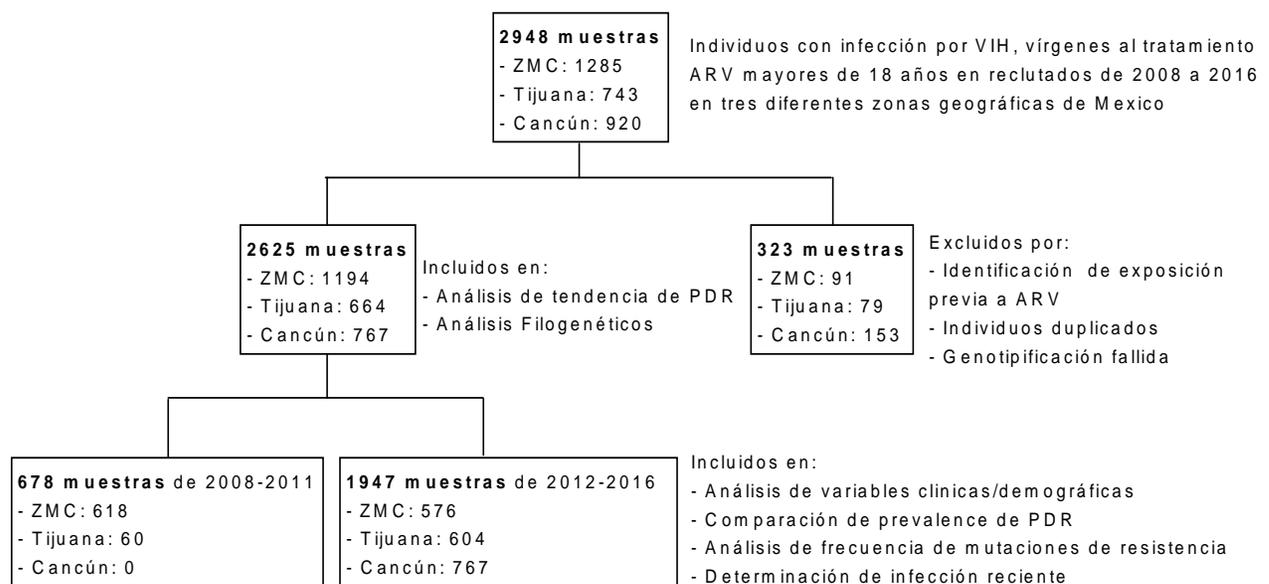


Figura 14: Diagrama de Flujo con la selección de los participantes. El número de participantes seleccionados y su inclusión en los diferentes análisis es mostrado. ZMC, Zona Metropolitana del Centro, ARV, antirretrovirales, PDR, resistencia pretratamiento.

El presente estudio formó parte del protocolo E10-10 que fue revisado y aprobado por el H. Comité de Ética del INER y se condujo de acuerdo a la Declaración de Helsinki. Cada participante firmó una carta de consentimiento por escrito previo a una donación de muestra única de sangre colectada como sigue: 3 tubos de EDTA (BD, San José, CA) de 6 mL, 2 tubos de EDTA-PPT (BD, San José, CA) de 5 mL y 1 tubo de EDTA (BD, San José, CA) de 4 mL.

Al momento de la donación de sangre se aplicó un cuestionario para obtener datos demográficos de cada uno de los participantes. Las muestras fueron embaladas y enviadas al Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del INER en la Ciudad de México, donde fueron procesadas.

Conteo de CD4+ y carga viral en plasma

La Carga Viral en plasma (CVp) y la cuenta de linfocitos T CD4+ son pruebas de seguimiento que se realizan rutinariamente en el INER a las personas que viven con VIH. De las muestras obtenidas de los pacientes, los tubos con EDTA (BD, San José, CA) se usaron para ensayos moleculares de evaluación de resistencia y para conteo de linfocitos T CD4+ por Citometría de Flujo usando el kit Trucount en el instrumento FACSCanto II (BD Biosciencias, San José, CA). Los tubos EDTA-PPT (BD, San José, CA) se usaron para determinación de CVp mediante el sistema m2000 (Abbott, Abbott Park, IL).

Secuenciación del gen pol VIH

De los tubos con EDTA, se separaron y criopreservaron alícuotas de 1 mL de plasma. A partir de 1 mL de plasma se extrajo RNA viral usando un kit comercial (QIAmp Viral RNA Kit; Valencia, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se obtuvo un fragmento que incluía proteasa (PR) y retrotranscriptasa (RT), inicialmente, mediante un protocolo casero estandarizado (Posiciones HXB2: PR 1-99, RT 1-335)⁸⁵. Posteriormente, para estandarizar con otros laboratorios pertenecientes a la OMS, el fragmento PR-RT se obtuvo mediante el protocolo estandarizado del CDC (Posiciones HXB2: PR 6-99, RT 1-251).⁸⁶

Tanto para el método casero como para el método de CDC se hizo RT-PCR anidada con los iniciadores mostrados en la tabla 1. En ambos métodos se usaron 0.5 uL de SuperScript III OneStep RT PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 0.1 uL de polimerasa Platinum Taq DNA (Invitrogen) para las primeras y segundas rondas de amplificación, respectivamente, de acuerdo a lo recomendado por el fabricante, en volúmenes finales de 25 uL, con concentración final de 5% de DMSO.

Los amplicones fueron visualizados en gel de agarosa al 1% y purificados con un kit comercial (QIAquick PCR Purification Kit; QIAGEN). Las secuencias fueron obtenidas usando la química de BigDye terminator 3.1 (Thermo Fisher, Waltham, MA) en el secuenciador automático 3730xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher, Waltham, MA). Las secuencias fueron ensambladas y editadas usando la herramienta Recall (<http://pssm.cfenet.ubc.ca/>) (University of Columbia, CA). El control de calidad de las secuencias se realizó en la herramienta de OMS (http://pssm.cfenet.ubc.ca/who_gc/). Ambas herramientas son recomendadas por la OMS y están disponibles en línea.

Tabla 1: Iniciadores usados en el estudio

	Nombre del iniciador	Secuencia del iniciador (5'-->3')	Posición en HXB2	Propósito
Método Casero Estandarizado	PR 5' OUTER	CCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTG	2009–2030	RT- PCR
	RT 3' OUTER	GTTTTAGATTTTTTAAATGGCTCTTG	3576–3602	RT- PCR
	PR 5' INNER	TGAAAGATTGTACTGAGAGACAGG	2057–2080	PCR
	RT 3' INNER	GGCTCTTGATAAATTTGATATGTCC	3559–3583	PCR
	POL A	CCAGAAGAGAGCTTCAGGTCTGGGG	2164–2288	Secuenciación
	POL B	GTTAAACAATGGCCATTGACAGAAG	2610–2634	Secuenciación
	POL C	GGAAAGGATCACCAGCAATATTCCA	3007–3031	Secuenciación
	POL D	CCCTCARATCACTCTTTGGCAACG	2252–2275	Secuenciación
	POL F	CTTTTGGGCCATCCATTCCTGGCTT	2586–2610	Secuenciación
	POL G	CCATCCCTGTGGAAGCACATTGTA	2985–3008	Secuenciación
POL H	TGCCCTGCTTCTGTATTTCTGCTA	3526–3550	Secuenciación	
Método Estandarizado de CDC	PRTM-F1 I	TGAARGAITGYACTGARAGRCAGGCTAAT	2057–2085	RT-PCR, parte 1
	PRTM-F1 II	ACTGARAGRCAGGCTAATTTTTTAG	2068–2092	RT-PCR, parte 2
	RT-R1	ATCCCTGCATAAATCTGACTTGC	3370–3348	RT-PCR
	PRT-F2	CTTTARCTTCCCTCARATCACTCT	2243–2266	PCR y Secuenciación
	RT-R2	CTTCTGTATGTCAATTGACAGTCC	3326–3304	PCR y Secuenciación
	SeqF3	AGTCCTATTGARACTGTRCCAG	2556–2577	Secuenciación
	SeqR3	TTTTYCTTCTGTCAATGGCCA	2639–2619	Secuenciación
	SeqF4	CAGTACTGGATGTGGGRGAYG	2869–2889	Secuenciación
	SeqR4	TACTAGGTATGGTAAATGCAGT	2952–2931	Secuenciación

Estimación de resistencia a fármacos

A partir de las secuencias del gen *pol* obtenidas, se estimó la resistencia del VIH usando la herramienta HIVdb v8.3 de la Universidad de Stanford (<https://hivdb.stanford.edu/>), disponible en línea. Se definió como resistentes a aquellas secuencias virales con un Score de Stanford (SS) ≤ 15 para cualquiera de los siguientes antirretrovirales: nevirapina, efavirenz, cualquier Inhibidor análogo de nucleósidos (NRTI), darunavir/ritonavir, lopinavir/ritonavir o atazanavir/ritonavir, de acuerdo al criterio recomendado por la OMS.⁶⁰ Para evaluar resistencia a los esquemas de tratamiento se consideró resistencia cuando cualquiera de los componentes del esquema tenía un SS ≤ 15 .

Para evaluar resistencia individual a cada fármaco antirretroviral o a los esquemas de tratamiento, se utilizaron los siguientes umbrales: nivel bajo (15-29), intermedio (30-59) y alto (>60) de resistencia, de acuerdo a los puntajes de la herramienta HIVdb v8.3.

La frecuencia de mutaciones de resistencia fue calculada por conteo directo de las mismas (ausencia o presencia), incluyendo todas las mutaciones consideradas en la herramienta HIVdb v8.3.

Determinación de infección reciente

La infección reciente (RI, *recent infection*) en los participantes se identificó, indirectamente, mediante un algoritmo que minimiza falsos diagnósticos recientes. El algoritmo consistió en lo siguiente: en individuos con < 1 año de diagnóstico, conteo de CD4+ ≥ 200 células/ μ L, CVp > 400 copias de RNA/mL,

se les hizo la prueba de avidéz de anticuerpos IgG específicos de VIH (HIV-1-Lag-Avidity; Sedia, Portland, OR) por duplicado en plasma.⁸⁷ Típicamente, las personas con infección por VIH tienen una avidéz y proporción de anticuerpos más baja en los primeros meses de la infección que puede determinarse por avidéz.⁸⁸

Se consideró infección reciente en aquellas muestras que cumplieron los criterios para hacerles la prueba de avidéz de anticuerpos y cuyo resultado de densidad óptica normalizada (ODn) fue ≤ 1.5 . Los resultados con $ODn \leq 1.5$ fueron confirmados nuevamente por duplicado. Las muestras de participantes que no cumplieron con los criterios para hacerles prueba de avidéz de anticuerpos o que en las pruebas de avidéz tuvieron resultado de $ODn > 1.5$, se clasificaron en el grupo con infección establecida (LSI, *long-standing infection*). El algoritmo para RI utilizado tiene un periodo de ventana de 130 días (95% CI 118-142).⁸⁷

Análisis filogenético

Para examinar la diseminación de virus resistentes en las zonas geográficas de estudio, se construyeron árboles filogenéticos usando las secuencias del gen *pol* obtenidas y se buscaron clusters (grupos de secuencias virales) con resistencia. Primero, las secuencias fueron alineadas por codones usando ClustalW en Mega v.6,⁸⁹ previa remoción de codones asociados con resistencia de acuerdo a la herramienta HIVdb v8.3. Luego, se construyeron árboles filogenéticos usando Maximun Likelihood con el modelo de sustitución de nucleótidos GTR+ Γ +I en la herramienta FastTree 2.1.9 (<http://microbesonline.org/fasttree>).⁹⁰ En los alineamientos y árboles se incluyeron secuencias de referencia de diferentes subtipos de VIH que se obtuvieron de la base de secuencias de Los Alamos (www.hiv.lanl.gov). Los árboles obtenidos se visualizaron y colorearon en Mega v.6. Por último, los posibles clusters de transmisión fueron identificados usando la herramienta Cluster Picker,⁹¹ con un umbral de distancia genética de $\geq 1.5\%$.⁹² La herramienta Cluster Picker permite la identificación de clusters en árboles filogenéticos soportado por el nodo o agrupamiento de secuencias (bootstraps y probabilidad) y la distancia genética máxima pareada dentro del cluster.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando GraphPad Prism v7 (San Diego, CA). Las comparaciones entre grupos se realizaron usando las pruebas de exacta de Fisher o Chi cuadrada para variables categóricas o agrupadas y Kruskal-Wallis o Mann-Whitney para variables numéricas. Para observar tendencias de resistencia y frecuencia de mutaciones en el tiempo, se usó correlación de Spearman. $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

V. RESULTADOS

Características clínicas y epidemiológicas de las poblaciones de estudio

Se analizaron y compararon datos demográficos y clínicos de participantes enrolados en el periodo 2012 a 2016, que fue el periodo con reclutamiento activo en las tres zonas, (Tabla 2).

Tabla 2. Características clínicas y demográficas de los individuos en estudio 2012-2016.

Variable clínica/demográfica	Zona Metropolitana	Tijuana	Cancún	Valor de p ^a
Número de individuos	576	604	767	
Mediana de edad, años (IQR)	30 (24-37)	34 (26-42)	30 (24-37)	< 0.0001
Género, n (%)				
Hombre	520 (90.3)	430 (71.2)	638 (83.2)	< 0.0001
Mujer	56 (9.7)	174 (28.8)	129 (16.8)	< 0.0001
Mediana de log CV, copias RNA/mL (IQR)	5.1 (4.5-5.6)	4.9 (4.3-5.5)	4.9 (4.4-5.4)	0.0004
Mediana de LT CD4+, cels/μL (IQR)	257 (102-413)	222 (65-444)	255 (106-447)	ns
Mediana del % de LT CD4+ T cels/μL (IQR)	14 (7-19)	14 (7-22)	13 (7-20)	ns
Infección Reciente, n (%)				
Reciente ^b	157 (27.3)	166 (27.5)	212 (27.6)	ns
Establecida	419 (72.7)	438 (72.5)	555 (72.4)	ns
Estado civil, n (%)				
Unión Libre	36 (6.2)	158 (26.2)	134 (17.3)	< 0.0001
Casado	61 (10.6)	48 (7.9)	62 (9.3)	ns
Soltero	384 (66.7)	368 (60.9)	556 (72.5)	< 0.0001
Otro/desconocido	95 (16.5)	30 (5.0)	16 (2.1)	< 0.0001
Nivel educativo, n (%)				
No sabe leer ni escribir	2 (0.3)	9 (1.5)	24 (3.1)	0.0006
Primaria	25 (4.3)	156 (25.8)	113 (14.7)	< 0.0001
Secundaria	226 (39.2)	314 (52.0)	401 (52.3)	< 0.0001
Universitario/Técnico	230 (39.9)	82 (13.6)	190 (24.8)	< 0.0001
Posgrado	14 (2.4)	3 (0.5)	7 (0.9)	0.0063
Otro/desconocido	79 (13.7)	40 (6.6)	32 (4.2)	< 0.0001
Situación laboral, n (%)				
Empleado	307 (53.3)	171 (28.3)	377 (49.2)	< 0.0001
Desempleado	131 (22.7)	309 (51.2)	303 (39.5)	< 0.0001
Estudiante	56 (9.7)	11 (1.8)	40 (5.2)	< 0.0001
Otro/desconocido	82 (14.2)	113 (18.7)	47 (6.1)	< 0.0001
Factor de riesgo para VIH, n (%)				
Heterosexual	113 (19.6)	330 (54.6)	289 (37.7)	< 0.0001
HSH	305 (52.9)	131 (21.5)	346 (45.1)	< 0.0001
Bisexual	20 (3.5)	50 (8.3)	26 (3.4)	< 0.0001
UDI	3 (0.5)	37 (6.1)	10 (1.3)	< 0.0001
Otro/desconocido	135 (23.4)	52 (8.6)	96 (12.5)	< 0.0001
Subtipo, n (%)				
B	569 (98.8)	696 (98.9)	756 (98.6)	ns
No-B	7 (1.2)	8 (1.1)	11 (1.4)	ns

^ap<0.05 fue considerado estadísticamente significativo usando chi² o Kruskal-Wallis

^bInfección reciente fue definida usando un algoritmo descrito en metodología.

HSH, hombres que tienen sexo con hombres; UDI, Usuarios de drogas intravenosas; ns, no estadísticamente significativo; IQR, rango intercuartil.

Las tres zonas se caracterizaron por reclutar pacientes en etapas tardías de la infección por VIH (Conteo de LT CD4+ de 257 en la Zona Metropolitana, 255 en Cancún y 222 en Tijuana). Sin embargo, se observaron diferencias entre las zonas en la mayoría de las variables demográficas. La mediana de edad fue más alta en Tijuana (34 años, $p < 0.0001$) que en la Zona Metropolitana (30 años) y Cancún (30 años). La proporción de mujeres también fue más alta en Tijuana (28.8%, $p < 0.0001$) que en la Zona Metropolitana (9.7%) y Cancún (16.8%). Por el contrario, Tijuana mostró menores niveles de escolaridad, particularmente, personas con carrera técnica o licenciatura (13.6, $p < 0.0001$) comparado con Cancún (24.8%) y la Zona Metropolitana (39.9%). Tijuana también mostró menor porcentaje de personas empleadas (28.3%, $p < 0.0001$) que Cancún (49.2%) y que la Zona Metropolitana (53.3%).

La proporción de hombres que tienen sexo con hombres (HSH) fue mayor en la Zona Metropolitana (52.9%, $p < 0.0001$), seguido de Cancún (45.1%) y Tijuana (21.5%). Por el contrario, hubo más personas heterosexuales en Tijuana (54.6%, $p < 0.0001$) que en la Zona Metropolitana (19.6%) y Cancún (37.7%). La proporción de usuarios de drogas inyectadas (UDI) fue más alto en Tijuana (6.1%, $p < 0.0001$) que en la Zona Metropolitana (0.5%) y Cancún (1.3%).

El Subtipo B fue el más prevalente, con más del 98% en cada una de las zonas geográficas estudiadas. Sin embargo, aunque en muy baja frecuencia, también se encontraron algunos subtipos no B, entre ellos los subtipos C, G y F1, así como los recombinantes BD, CRF12_BF y CRF18_cpx. Estas observaciones sugieren distintos panoramas epidemiológicos para cada una de las zonas geográficas estudiadas. Por ejemplo: diferentes modos de transmisión y diagnóstico todavía más tardío en algunas zonas geográficas del país. Esto justificaría diferentes estrategias de manejo de la infección por VIH por región.

Comparación de resistencia pretratamiento entre zonas geográficas

La prevalencia de resistencia pretratamiento (PDR) a cualquier ARV, a NRTIs, NNRTIs y PIs se comparó en el periodo 2012-2016 en las tres zonas geográficas. La prevalencia de PDR a cualquier ARV en las tres zonas juntas fue de 11.1% (95%, CI 9.8%-12.6%), siendo los NNRTIs (7.2%, [95%, CI 6.1%-8.5%]) la clase de ARV más afectada ($p < 0.0001$), seguido de los NRTIs (4.0% [95%, CI 3.1%-4.9%]) y los PIs (1.6% [95%, CI 1.1%-2.3%]) (Figura 15).

Al analizar las zonas geográficas por separado, consistentemente se encontraron niveles moderados de PDR a cualquier ARV. En la Zona Metropolitana, la prevalencia de PDR a cualquier ARV fue 13.4% (95% CI 10.7%-16.4%), en Tijuana 8.9% (95% CI 6.8%-11.5%) y en Cancún 11.2% (95% CI 9.1%-13.7%). De la misma manera, la prevalencia de PDR a NNRTIs fue la más alta en las tres zonas geográficas: 8.7% ($p < 0.0001$ respecto a las otras clases de ARV) en la Zona metropolitana, 4.8%

($p=0.0156$) en Tijuana y 8.1% ($p<0.0001$) en Cancún. La prevalencia de PDR a PIs fue la más baja en cada una de las zonas geográficas con menos de 2.0% de prevalencia en cada región (Figura 15).

Al comparar entre zonas, la PDR a NNRTIs fue menor en Tijuana que en la Zona Metropolitana ($p=0.0100$) y que en Cancún ($p=0.0161$). Las PDR a cualquier ARV, a NRTIs y a PIs fueron similares entre zonas.

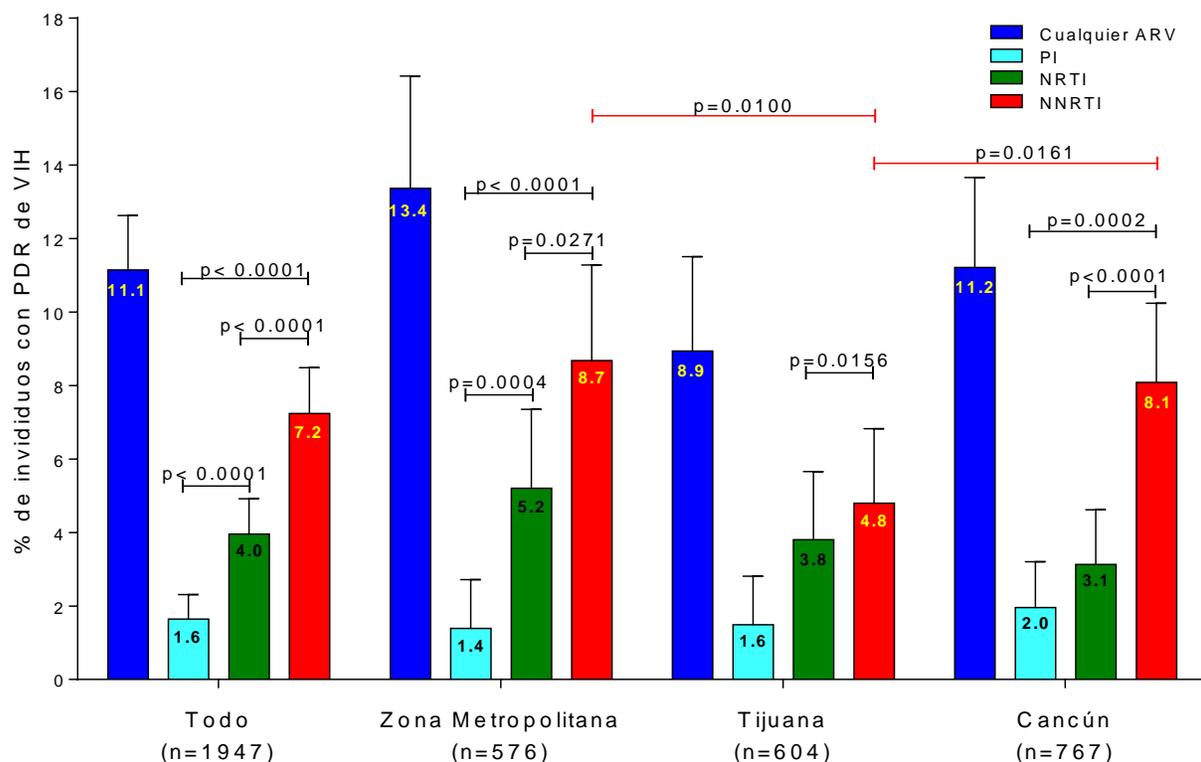


Figura 15. Prevalencia de resistencia pretratamiento en tres regiones de la epidemia de VIH en México en 2012-2016. PDR fue estimada a partir de las secuencias de proteasa y retrotranscriptasa usando la herramienta HIVdb (v8.3) de la universidad de Stanford. Se definió como resistente a aquellas secuencias con puntaje ≥ 15 para los siguientes ARV: darunavir/ritonavir, lopinavir/ritonavir, atazanavir/ritonavir, cualquier NRTI, nevirapina y efavirenz. Las barras de error representan intervalos de confianza del 95%. Se muestran comparaciones estadísticamente significativas ($p<0.05$, prueba exacta de fisher). ARV, antirretroviral; NNRTI, inhibidores no análogos de nucleósidos de la RT; NRTI, inhibidores análogos de nucleósidos de la RT; PI, inhibidores de proteasa.

No se observaron diferencias en características epidemiológicas y clínicas entre individuos con y sin resistencia pretratamiento en ninguna de las zonas (datos no mostrados).

Estos resultados, confirman el dominio de resistencia pretratamiento a NNRTIs en cada una de las zonas geográficas evaluadas, pero sugiere niveles más bajos de prevalencia de resistencia pretratamiento en Tijuana.

Patrón de mutaciones asociadas con resistencia a antirretrovirales

El patrón de mutaciones asociadas con resistencia a antirretrovirales (DRM, *drug resistance mutations*) fue diferente entre zonas, especialmente mutaciones para NNRTIs; sin embargo, las mutaciones más prevalentes fueron conservadas en cada una de las tres zonas geográficas.

Las mutaciones más prevalentes para PIs fueron: Q58E (1.4%) y M46IL (0.7%) en la Zona Metropolitana; M46IL (2.0%) y Q58E (1.0%) en Tijuana; y M46IL (2.0%) y L90M (1.3%) en Cancún. Sin embargo, en Cancún L90M (1.3%, $p=0.0002$) e I54V (1.0%, $p=0.0374$) fueron más prevalentes (Figura 16a).

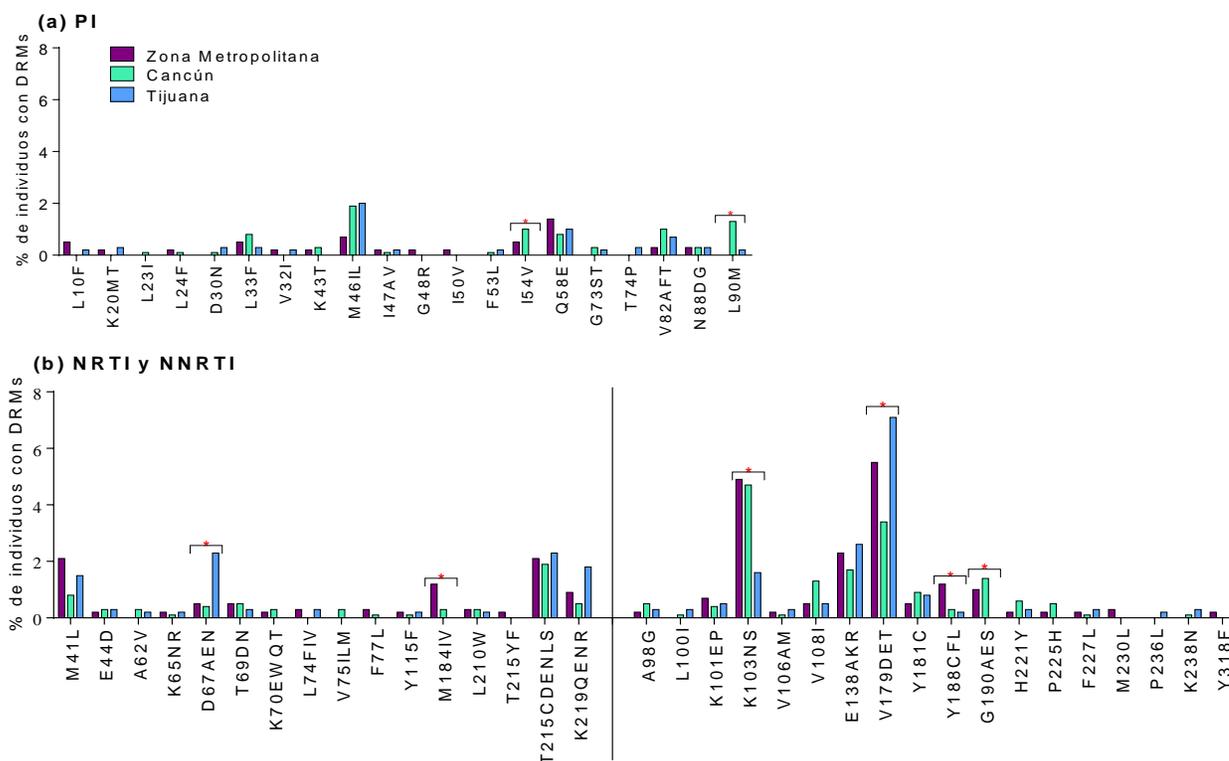


Figura 16. Prevalencia de DRM en las tres zonas estudiadas de 2012-2016. Se incluyeron todas las DRM consideradas en la herramienta HIVdb (v.8.3) de la universidad de Stanford, mostrando aquellas mutaciones con frecuencia >0 en al menos una región. Se muestran comparaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$, prueba chi2). NNRTI, inhibidores no análogos de nucleósidos de la RT; NRTI, inhibidores análogos de nucleósidos de la RT; PI, inhibidores de proteasa.

Las mutaciones más prevalentes para NRTIs fueron: M41L y la revertante T215 en la Zona Metropolitana (2.1% cada una) y Cancún (1.5% y 2.0%, respectivamente) y D67AEN (2.3%) y la revertante T215 (2.3%) en Tijuana. Sin embargo, D67AEN fue más frecuente en Tijuana (2.3%, $p=0.0007$) y M184V en la Zona Metropolitana (1.2%, $p=0.0015$) (Figura 16b).

Las mutaciones más prevalentes para NNRTIs fueron: V179DET (5.6%) y K103NS (4.7%) en la Zona Metropolitana; K103N (4.4%) y V179DET (3.4%) en Cancún y V179DET (7.1%) y E138AKR (2.6%) en Tijuana. Sin embargo y de manera interesante, K103N fue menos frecuente en Tijuana (1.7%, $p=0.0069$), mientras V179DET fue más frecuente (7.1%, $p=0.0075$). Y188CFL fue más frecuente en la Zona Metropolitana (1.2%; $p=0.0189$) y G190AES fue menos frecuente en Tijuana (0%; $p=0.0158$) (Figura 16b).

Todos estos resultados sugieren diferente distribución de frecuencia en las tres zonas geográficas estudiadas. En particular, es notable la baja frecuencia de K103N en Tijuana y alta frecuencia en la Zona Metropolitana y Cancún.

Resistencia individual a los antirretrovirales y a los esquemas de tratamiento más usados en México

Se consideró resistencia a cualquier ARV cuando el puntaje en la base HIVdb v8.3 fue $SS \geq 15$. Adicionalmente, se clasificó como resistencia baja ($SS \geq 15-29$), intermedia ($SS 30-59$) o alta ($SS \geq 60$). En general, los ARV más afectados por PDR, fueron los NNRTIs nevirapina (NVP, 6.1%) y efavirenz (EFV, 5.7%) (Figura 16a). Consecuentemente, resistencia al esquema de tratamiento más utilizado en México: tenofovir+emtricitabina+efavirenz (TDF+FTC+EFV), fue 7.9%. PDR a otros esquemas basados en efavirenz fue similar, influenciado justamente por PDR a este fármaco, mientras que esquemas basados en PI tuvieron menos resistencia pretratamiento.

Considerando las zonas geográficas por separado, los niveles de PDR a nevirapina y efavirenz fueron los más altos tanto para la Zona Metropolitana (8.7% y 8.3%) como para Tijuana (4.5% y 4.0%) y Cancún (7.2% y 6.6%) (Figuras 17b-d). Sin embargo, al comparar entre zonas geográficas, los niveles de PDR a nevirapina y a efavirenz, en Tijuana fueron más bajos comparado con la Zona Metropolitana y Cancún ($p < 0.05$ en todos los casos, datos no mostrados). De manera interesante, PDR a rilpivirina (RPV), estuvo entre las más altas (5.6% para la Zona Metropolitana, 4.3 para Cancún y 5.6% para Tijuana) (Figura 17b-d) y en concordancia con la alta prevalencia de la mutación que con mayor frecuencia rilpivirina selecciona: E138AKR (2.3% en Zona Metropolitana, 2.6% en Tijuana y 1.7% en Cancún) (Figura 16b).

PDR a los esquemas de tratamiento de primera vez fue influenciada por EFV, principalmente. En la Zona Metropolitana, PDR a TDF+FTC+EFV alcanzó 10.1%, abacavir+lamivudina+efavirenz (ABC+3TC+EFV) tuvo 9.9% y zidovudina+lamivudina+efavirenz (AZT+3TC+EFV) tuvo 11.8%. En Cancún, PDR a TDF+FTC+EFV y a ABC+3TC+EFV fue 80.0% para cada uno y PDR a AZT+3TC+EFV fue 8.3%. En Tijuana, PDR a estos tres esquemas fue menor que en la Zona

Metropolitana y Cancún. PDR a TDF+FTC+EFV y a ABC+3TC+EFV en Tijuana fue 5.6% para cada uno y 7.1% para AZT+3TC+EFV.

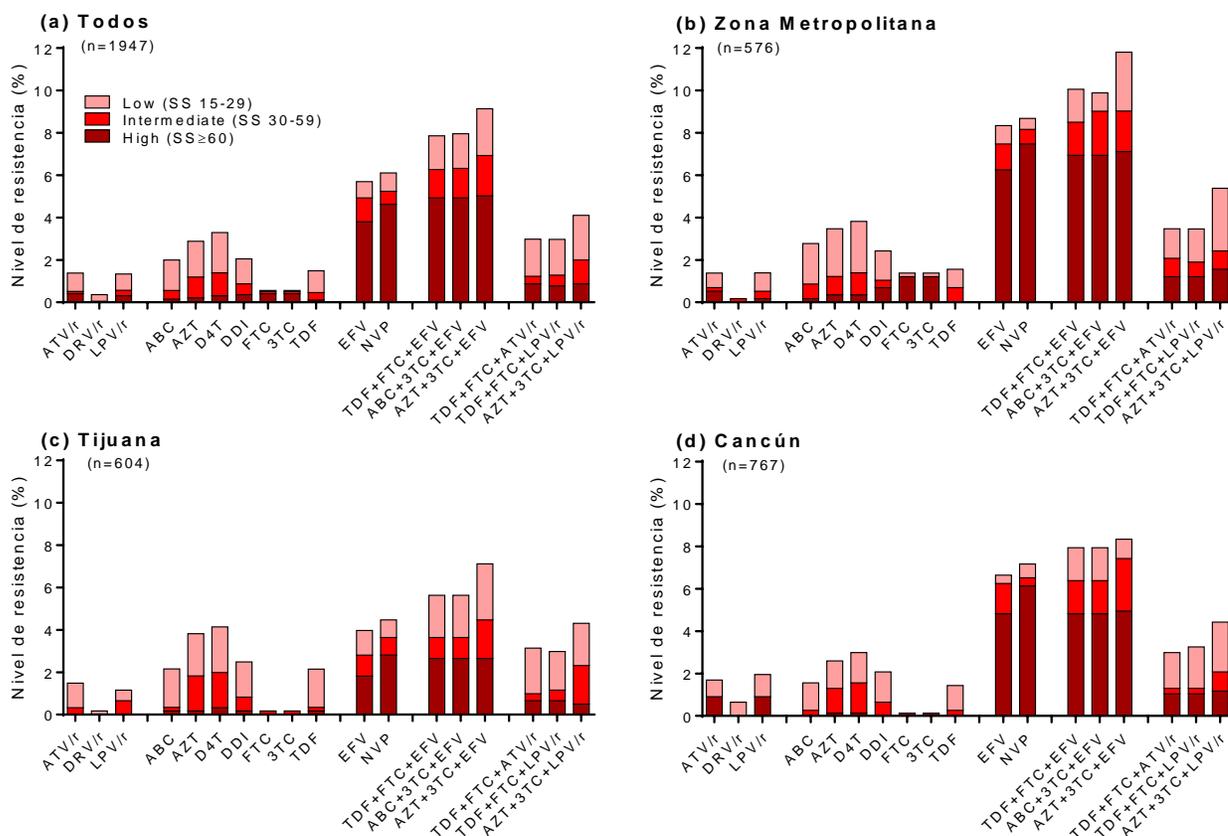


Figure 17. Niveles de resistencia por ARV y esquemas de tratamiento en 2012-2016. Los niveles de resistencia a cada antirretroviral se estimaron a partir de las secuencias de proteasa y retrotranscriptasa virales usando la herramienta HIVdb (v8.3) de la universidad de Stanford. Los niveles de resistencia se clasificaron de acuerdo al puntaje de Stanford (SS) como alto: $SS \geq 60$, intermedio: $SS 30-59$, bajo: $SS \geq 15-29$. Se muestra la resistencia de antirretrovirales que recomienda la OMS incluir para PDR, así como los esquemas de tratamiento de primera vez más usados. PI: atazanavir/r (ATV/r), darunavir/r (DRV/r), lopinavir/r (LPV/r). NRTI: lamivudina (3TC), abacavir (ABC), zidovudina (AZT), estavudina (D4T), didanosina (DDI), emtricitabina (FTC), tenofovir (TDF); NNRTI: efavirenz (EFV), nevirapina (NVP).

Como se esperaba, los esquemas de tratamiento basados en PIs fueron menos afectados que los basados en NNRTIs. El régimen de tratamiento basado en PIs más usado, TDF+FTC+ATV/r alcanzó resistencia de 3.5% en la Zona metropolitana, 3.0% en Tijuana y 3.0% en Cancún (Figura 17b-d). Todos estos resultados son consistentes con la observación de que, en las zonas geográficas estudiadas, efavirenz y nevirapina son los antirretrovirales más afectados, así como los esquemas de tratamiento a basados en efavirenz, que son los más utilizados, en particular TDF+FTC+EFV.

Incremento de resistencia pretratamiento en el tiempo

Se buscaron tendencias de cambios de PDR en el tiempo en las tres zonas geográficas. Para ello, de la Zona Metropolitana se incluyeron 1,193 secuencias virales de participantes reclutados de 2008 a 2016; de Tijuana, se incluyeron 60 secuencias virales de participantes reclutados en 2008 y 604 secuencias de 2012 a 2016; y de Cancún, se incluyeron 767 secuencias de participantes reclutados de 2012 a 2016.

Considerando juntas las zonas tres zonas geográficas, se observó tendencia de incremento de PDR a cualquier ARV (7.5% a 12.7%, $p=0.0589$, $r=0.666$) de 2008 a 2016. Esta tendencia de incremento de PDR a cualquier ARV fue atribuible al incremento significativo de PDR a NNRTI (1.9% a 9.9%, $p<0.0001$, $r=0.98$) (Figura 18a). PDR a PI y a NRTI permanecieron estables a lo largo del tiempo de estudio (1.3 % a 1.4%, $p=0.677$, $r=0.17$; y 5.6% a 3.0%, $p=0.8432$, $r=-0.08$, respectivamente).

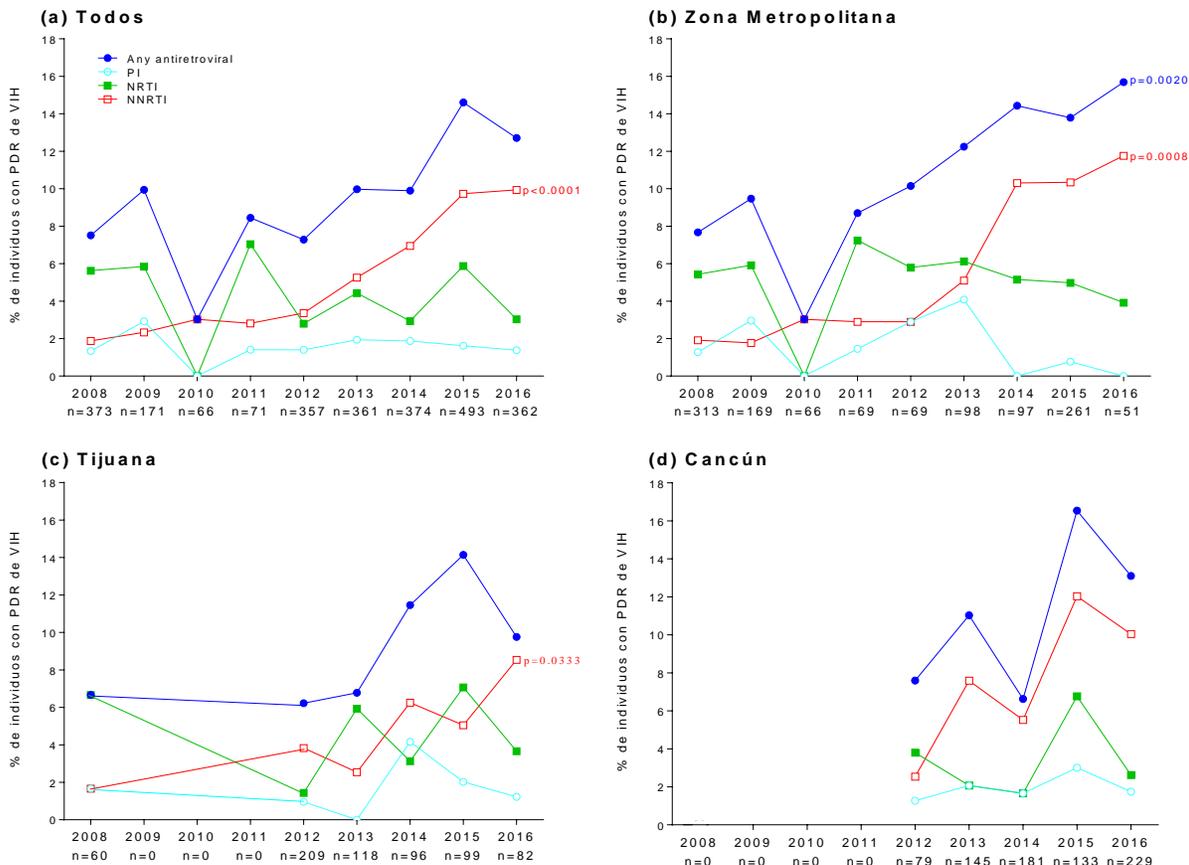


Figure 18. Cambios de resistencia pretratamiento en el tiempo. Se estimaron las prevalencias de PDR a partir de las secuencias de proteasa y retrotranscriptasa por año, usando la herramienta HIVdb (v8.3) de la universidad de Stanford. Se definió PDR en aquellos individuos cuyas secuencias virales tenía puntaje de Stanford (SS) ≥ 15 a cualquier ARV. Se muestra incremento significativo ($p<0.05$, correlación de Spearman). PDR, resistencia pretratamiento; NNRTI, Inhibidores no análogos de nucleósidos de la RT; NRTI, Inhibidores análogos de nucleósidos de la RT; PI, Inhibidores de proteasa.

Al analizar las zonas geográficas por separado, se observó incremento de PDR a cualquier ARV (7.7% a 15.7%, $p=0.0020$, $r=0.90$) y a NNRTI (1.9% a 11.8%, $p=0.0008$, $r=0.93$) en la Zona Metropolitana de 2008 a 2016. Tijuana también mostró incremento significativo de PDR a NNRTI (1.7% a 8.5%, $p=0.0333$, $r=0.88$) de 2008 a 2016 (Figura 18b y 18c). En la Zona Metropolitana ni en Tijuana se observó incremento de PDR a PI ni a NRTI. Cancún no mostró ningún incremento significativo de PDR de 2012 a 2016 a ninguna de las clases de antirretrovirales.

Considerando PDR a TDF+FTC+EFV, que es el esquema de tratamiento más usado en México, se observó un incremento de PDR a cualquier ARV al analizar las zonas geográficas juntas (2.9% to 9.1%, $p=0.0045$, $r=0.86$) de 2008 a 2016. Este incremento de PDR a TDF+FTC+EFV estuvo atribuible a un incremento de PDR a efavirenz (1.1% to 8.8%, $p=0.0002$, $r=0.97$) (Figures 19).

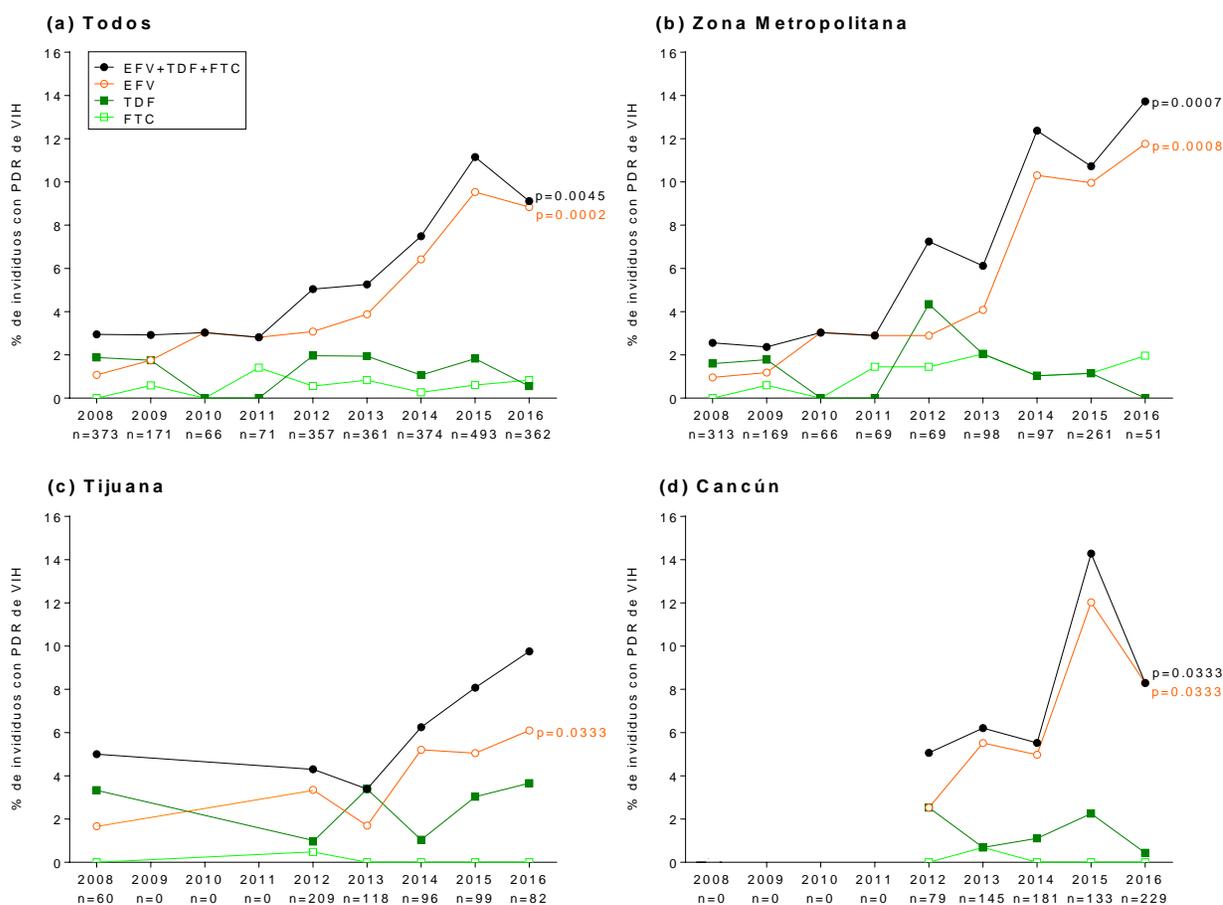


Figure 19. PDR temporal al esquema de tratamiento antirretroviral más usado en México. La prevalencia de resistencia a ARV y esquema de tratamiento más usado en México fue evaluada por año a partir de las secuencias de proteasa y retrotranscriptasa usando la herramienta HIVdb (v8.3) de la universidad de Stanford. Se definió a individuos con PDR a aquellos cuya secuencia viral tenía puntaje de Stanford (SS) \geq 15 a cualquier ARV. Se muestra incremento significativo ($p<0.05$, correlación de Spearman). EFV, efavirenz; TDF, tenofovir; FTC, emtricitabina; PDR, resistencia pretratamiento.

De manera interesante, incremento en PDR a efavirenz fue observado en las tres zonas geográficas de manera independiente (1.0% a 11.8%, $p=0.0008$, $r=0.93$ en Zona Metropolitana; 1.7% a 6.1%, $p=0.0333$, $r=0.88$ en Tijuana y 2.5% a 8.3%. $p=0.0333$, $r=0.88$ en Cancún) que resultó en un incremento en PDR a TDF+FTC+EFV en la Zona Metropolitana (2.6% a 13.7%, $p=0.0007$, $r=0.93$) y Cancún (5.1% a 8.3%, $p=0.0333$, $r=0.88$) (Figura 18). No se observó incremento significativo de PDR a TDF ni a FTC en ninguna de las zonas.

Luego, se buscaron cambios de frecuencia en el tiempo de mutaciones asociadas con resistencia que pudieran explicar el incremento de PDR en el periodo de estudio. Se evaluaron las mutaciones más frecuentes, incluyendo: M46I/L, Q58E y L90M para PI; M41L, TAMs, M184V y la revertante T215 para NRTI; K103N/S, V179DET, y E138A/K/R para NNRTI (Figura 20).

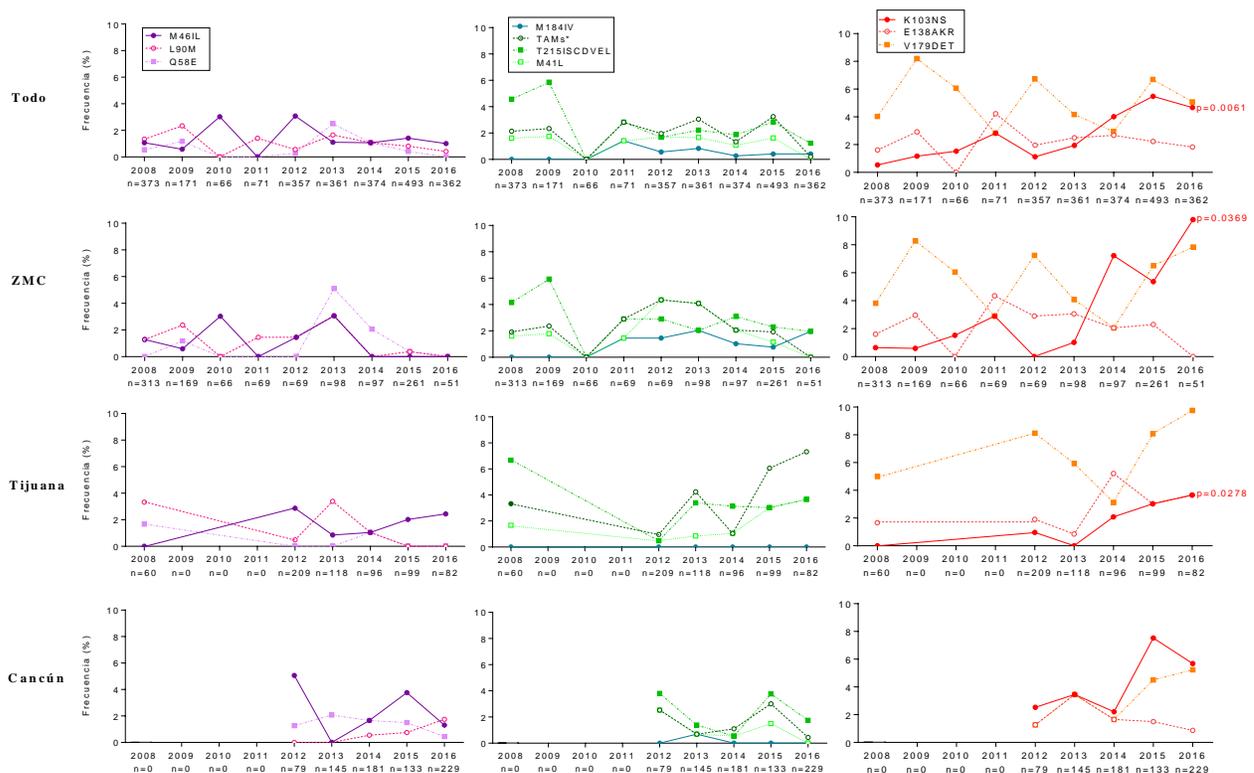


Figura 20. Cambios de frecuencia Temporal de mutaciones asociadas con resistencia. La frecuencia de mutaciones relevantes asociadas con resistencia fue estimada a partir de las secuencias de proteasa y retrotranscriptasa usando la herramienta HIVdb (v8.3) de la universidad de Stanford. Se muestran cambios significativos ($p<0.05$, correlación de Spearman). Mutaciones a PI se muestran en la columna de la izquierda, mutaciones a NRTI en la columna del centro y mutaciones a NNRTI en la columna de la derecha. *Mutaciones asociadas a análogos de timina incluye: M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F y K219Q/E.

Se observó un incremento de frecuencia en el tiempo de la mutación K103N/S al analizar las regiones geográficas juntas (0.5% a 4.7%, $p=0.0061$, $r=0.85$) de 2008 a 2016. Cuando se consideraron las zonas geográficas de manera independiente, también se observó incremento en el

tiempo de K103/S en la Zona Metropolitana (0.6% a 9.8%, $p=0.0369$, $r=0.72$) y en Tijuana (0.0% a 3.7%, $p=0.0278$, $r=0.90$).

Todos estos resultados confirman un incremento de resistencia pretratamiento a efavirenz en todas las regiones, explicado por incremento en frecuencia de K103N/S y, por lo tanto, también incremento de resistencia a los esquemas de tratamiento basados en efavirenz.

Prevalencia de resistencia pretratamiento en personas con infección reciente

Se determinó infección reciente (RI, *recent infection*) o establecida (LSI, *long standing unfection*) en todas las personas que fueron reclutadas de 2012-2016, como se describe en metodología. La proporción de individuos con RI fue 27.3% en la Zona Metropolitana, 27.5% en Tijuana y 27.6% en Cancún (Tabla 3 y 4).

Al comparar las variables clínicas y demográficas en personas con infección reciente e infección establecida, como se esperaba, en las tres zonas geográficas las personas con infección reciente fueron más jóvenes, tuvieron cargas virales y conteos de linfocitos T CD4+ más altas, comparados con personas con infección establecida (Tabla 3). Del resto de las variables demográficas, la única diferencia consistente en las tres zonas fue que hubo una mayor proporción de hombres que tienen sexo con hombres en infección reciente que en infección establecida, lo que puede sugerir que los hombres que tienen sexo con hombres se diagnostican más tempranamente, principalmente en la Zona Metropolitana (63.1% de HSH en infección reciente contra 49.2% en infección establecida, $p=0.0036$). Mientras que, las personas heterosexuales acuden más tarde al diagnóstico, principalmente en Tijuana (45.5% en RI contra 58.3% en LSI, $p=0.0058$).

Se evaluó prevalencia de PDR en individuos con infección reciente. No se observaron diferencias en prevalencia de PDR entre individuos con infección reciente e infección establecida para ninguna clase de fármacos en ninguna de las zonas (Tabla 4). Consistente con los resultados previos, en la Zona Metropolitana y Cancún, PDR a NNRTI fue más alta que a NRTI y a PI tanto en infección reciente como en infección establecida ($p<0.001$ en todos los casos), mientras que en Tijuana PDR a NNRTI fue más alta en infección establecida ($p=0.02$), pero no en infección reciente.

Tabla 3. Características clínicas y demográficas de los individuos con infección reciente (RI)^a y establecida (LSI).

Variable clínica/demográfica	Zona Metropolitana (n=576)			Tijuana (n=604)			Cancún (n=767)		
	RI	LSI	p ^b	RI	LSI	p ^b	RI	LSI	p ^b
Número de individuos (%)	157 (27.3)	419 (72.7)		165 (27.6)	439 (72.4)		209 (27.6)	558 (72.4)	
Mediana de edad, años (IQR)	28 (24-34)	31 (25-39)	0.0001	29 (23-36)	35 (28-43)	<0.0001	27 (23-33)	30 (25-38)	<0.0001
Género, n (%)									
Hombre	144 (91.7)	376 (89.7)	ns	119 (72.1)	311 (70.8)	ns	177 (84.7)	461 (82.6)	ns
Mujer	13 (8.3)	43 (10.3)		46 (27.9)	128 (29.2)		32 (15.3)	97 (17.4)	
Mediana de log CV, copias RNA/mL (IQR)	4.9 (4.3-5.5)	5.1 (4.6-5.6)	ns	4.5 (3.9-5.0)	5.1 (4.5-5.6)	<0.0001	4.6 (4.2-5.0)	5.0 (4.4-5.4)	<0.0001
Mediana de LT CD4+, cels/μL (IQR)	400 (324-536)	174 (65-325)	<0.0001	486 (345-632)	116 (41-283)	<0.0001	449 (337-603)	176 (67-332)	<0.0001
Mediana del % de LT CD4+ T cels/μL (IQR)	19 (14-23)	11 (6-17)	<0.0001	22 (17-28)	10 (5-18)	<0.0001	19 (14-23)	11 (5-17)	<0.0001
Estado civil, n (%)									
Unión Libre	9 (5.7)	27 (6.4)	ns	33 (15.8)	100 (17.9)	ns	41 (24.8)	39 (26.7)	ns
Casado	13 (8.3)	48 (11.5)	ns	13 (6.2)	49 (8.8)	ns	9 (5.5)	39 (8.9)	ns
Soltero	121 (77.1)	263 (62.8)	0.0011	160 (76.6)	396 (71.0)	ns	108 (65.5)	260 (59.2)	ns
Otro/desconocido	14 (8.9)	81 (19.3)	ns	3 (1.4)	13 (2.3)	ns	7 (4.2)	23 (5.2)	ns
Nivel educativo, n (%)									
No sabe leer ni escribir	0 (0.0)	2 (0.5)	ns	0 (0.0)	9 (2.1)	ns	4 (1.9)	20 (3.6)	ns
Primaria	5 (3.2)	20 (4.8)	ns	37 (22.4)	119 (27.1)	ns	20 (9.6)	93 (16.7)	0.0159
Secundaria	58 (36.9)	168 (40.1)	ns	82 (49.7)	232 (52.8)	ns	118 (56.5)	283 (50.7)	ns
Universitario/Técnico	73 (46.5)	157 (37.5)	ns	33 (20.0)	49 (11.2)	ns	58 (27.8)	132 (23.7)	ns
Posgrado	6 (3.8)	8 (1.9)	ns	2 (1.2)	1 (0.2)	0.0073	3 (1.4)	4 (0.7)	ns
Otro/desconocido	15 (9.6)	64 (15.3)	ns	11 (6.7)	29 (6.6)	ns	6 (2.9)	26 (4.7)	ns
Situación laboral, n (%)									
Empleado	83 (52.9)	224 (53.5)	ns	48 (29.1)	123 (28.0)	ns	118 (56.5)	259 (46.4)	0.0149
Desempleado	31 (19.7)	100 (23.9)	ns	75 (45.5)	234 (53.3)	ns	67 (32.1)	236 (42.3)	0.0102
Estudiante	29 (18.5)	27 (6.4)	<0.0001	7 (4.2)	4 (0.9)	0.0120	15 (7.2)	25 (4.5)	ns
Otro/desconocido	14 (8.9)	68 (16.2)	ns	35 (21.2)	78 (17.8)	ns	9 (4.3)	38 (6.8)	ns
Factor de riesgo para VIH, n (%)									
Heterosexual	25 (15.9)	88 (21.0)	ns	75 (45.5)	256 (58.3)	0.0058	67 (32.1)	222 (39.8)	ns
HSH	99 (63.1)	206 (49.2)	0.0036	53 (32.1)	78 (17.8)	0.0002	119 (56.9)	227 (40.7)	<0.0001
Bisexual	7 (4.5)	13 (3.1)	ns	16 (9.7)	34 (7.7)	ns	6 (2.9)	20 (3.6)	ns
UDI	0 (0.0)	3 (0.7)	ns	11 (6.7)	29 (6.6)	ns	0 (0.0)	10 (1.8)	ns
Otro/desconocido	26 (16.6)	109 (26.0)	ns	10 (6.1)	42 (9.6)	ns	17 (8.1)	79 (14.2)	ns
Subtipo, n (%)									
B	153 (97.5)	416 (99.3)	ns	203 (97.1)	553 (99.1)	ns	203 (97.1)	553 (99.1)	ns
No-B	4 (2.5)	3 (0.7)	ns	6 (2.9)	5 (0.9)	ns	6 (2.9)	5 (0.9)	ns

^aInfección reciente fue definida usando un algoritmo descrito en metodología.

^bp < 0.05 fue considerado estadísticamente significativo usando chi² o Kruskal-Wallis

HSH, hombres que tienen sexo con hombres; UDI, Usuarios de drogas intravenosas; ns, no estadísticamente significativo; IQR, rango intercuartil.

Tabla 4. PDR en individuos con infección reciente e infección establecida

		n (%)	PDR a cualquier ARV % (95% CI)	PI % (95% CI)	NRTI % (95% CI)	NNRTI % (95% CI)	p ^b
Zona Metropolitana	Todo	576 (100.0)	13.1 (10.7-16.4)	1.4 (0.6-2.7)	5.2 (3.5-7.4)	8.7 (6.5-11.3)	<0.0001
	RI ^c	157 (27.3)	17.8 (12.2-24.7)	1.9 (0.5-5.5)	5.1 (2.2-9.8)	12.1 (7.4-18.3)	0.0008
	LSI	419 (72.7)	11.7 (8.8-15.2)	1.2 (0.4-2.8)	5.3 (3.3-7.8)	7.4 (5.1-10.3)	<0.0001
	p ^d		ns	ns	ns	ns	
Tijuana	Todo	604 (100.0)	8.9 (6.8-11.5)	1.5 (0.7-2.8)	3.8 (2.4-5.7)	4.8 (3.2-6.8)	0.005
	RI ^c	166 (27.5)	7.2 (3.8-12.3)	0.6 (0.1-3.3)	3.6 (1.3-7.7)	3.0 (1.0-6.9)	ns
	LSI	438 (72.5)	9.6 (7.0-12.7)	1.8 (0.8-3.6)	3.9 (2.3-6.1)	5.5 (3.5-8.0)	0.02
	p ^d		ns	ns	ns	ns	
Cancún	Todo	767 (100.0)	11.2 (9.1-13.7)	2.0 (1.1-3.2)	3.1 (2.0-4.6)	8.1 (6.3-10.2)	<0.0001
	RI ^c	212 (27.6)	11.3 (7.4-16.4)	0.9 (0.1-3.4)	2.8 (1.0-6.1)	8.5 (5.1-13.1)	0.0002
	LSI	555 (72.4)	11.2 (8.7-14.1)	2.3 (1.3-4.0)	3.2 (1.9-5.1)	7.9 (5.8-10.5)	<0.0001
	p ^d		ns	ns	ns	ns	

^a p<0.05 fue considerado estadísticamente significativo comparando NNRTI, PI y NRTI con prueba χ^2 .

^b RI fue definida como menos de 130 días de seroconversión usando el algoritmo descrito en Metodología.

^c p<0.05 fue considerado estadísticamente significativo comparando RI y LSI con la prueba exacta de Fisher ARV, cualquier ARV; RI, Infección Reciente; LSI, Infección establecida; CI, intervalo de confianza; ns, no significativo; PI, inhibidores de proteasa; NRTI, Inhibidores análogos de nucleósidos de la RT; NNRTI, Inhibidores no análogos de nucleósidos de la RT.

De manera interesante, se observó incremento significativo de PDR a NNRTI en el tiempo en individuos recientemente infectados en la Zona Metropolitana de 2012 a 2016 (0% a 23.1%, p=0.0167, r=1). Sin embargo, esto no se observó en individuos con infección establecida (Figura 21). No se observó incremento significativo de PDR en individuos con infección reciente o con infección establecida, en Tijuana ni Cancún.

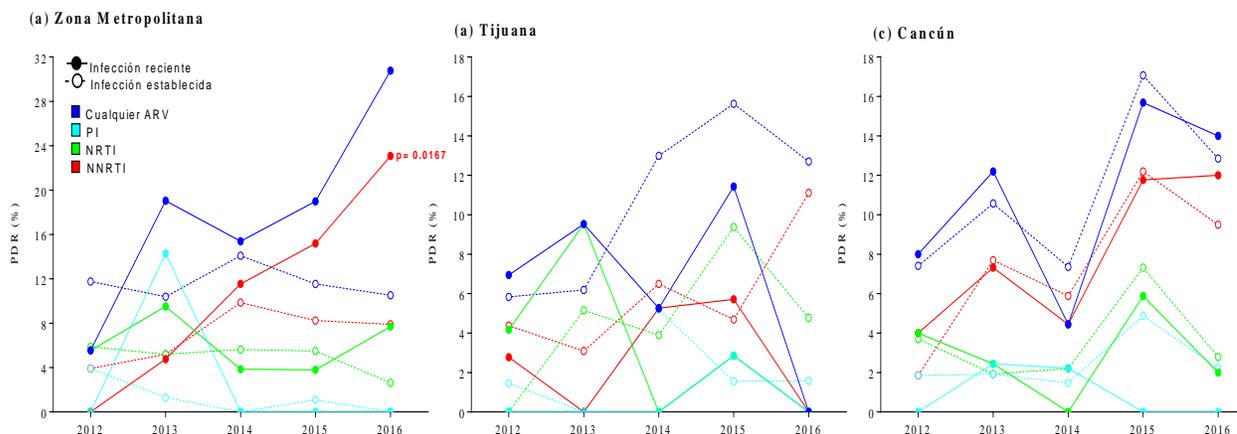


Figura 21. Tendencia de resistencia pretratamiento en individuos con infección reciente y con infección establecida. Infección reciente fue definida como con menos de 130 días usando el algoritmo descrito en métodos. Los niveles de resistencia por año de reclutamiento fueron estimados de las secuencias de proteasa y retrotranscriptasa usando la herramienta de HIVdb (v8.3) de la universidad de Stanford. Individuos con PDR fueron definidos como aquellos con puntaje ≥ 15 a cualquiera de los siguientes ARV: darunavir/ritonavir, lopinavir/ritonavir, atazanavir/ritonavir, cualquier NRTI, nevirapina y efavirenz. Se muestran tendencias significativas (p<0.05, correlación de Spearman). NNRTI, Inhibidores no análogos de nucleósidos de la RT; NRTI, Inhibidores análogos de nucleósidos de la RT; PI, Inhibidores de proteasa; PDR, resistencia pretratamiento

En la Zona Metropolitana, K103N fue la única mutación significativamente más frecuente en individuos con infección reciente (7.6%, $p=0.04$) que en individuos con infección establecida (3.6%) (Figura 22). Ninguna otra mutación en ninguna zona, mostró diferencia significativa.

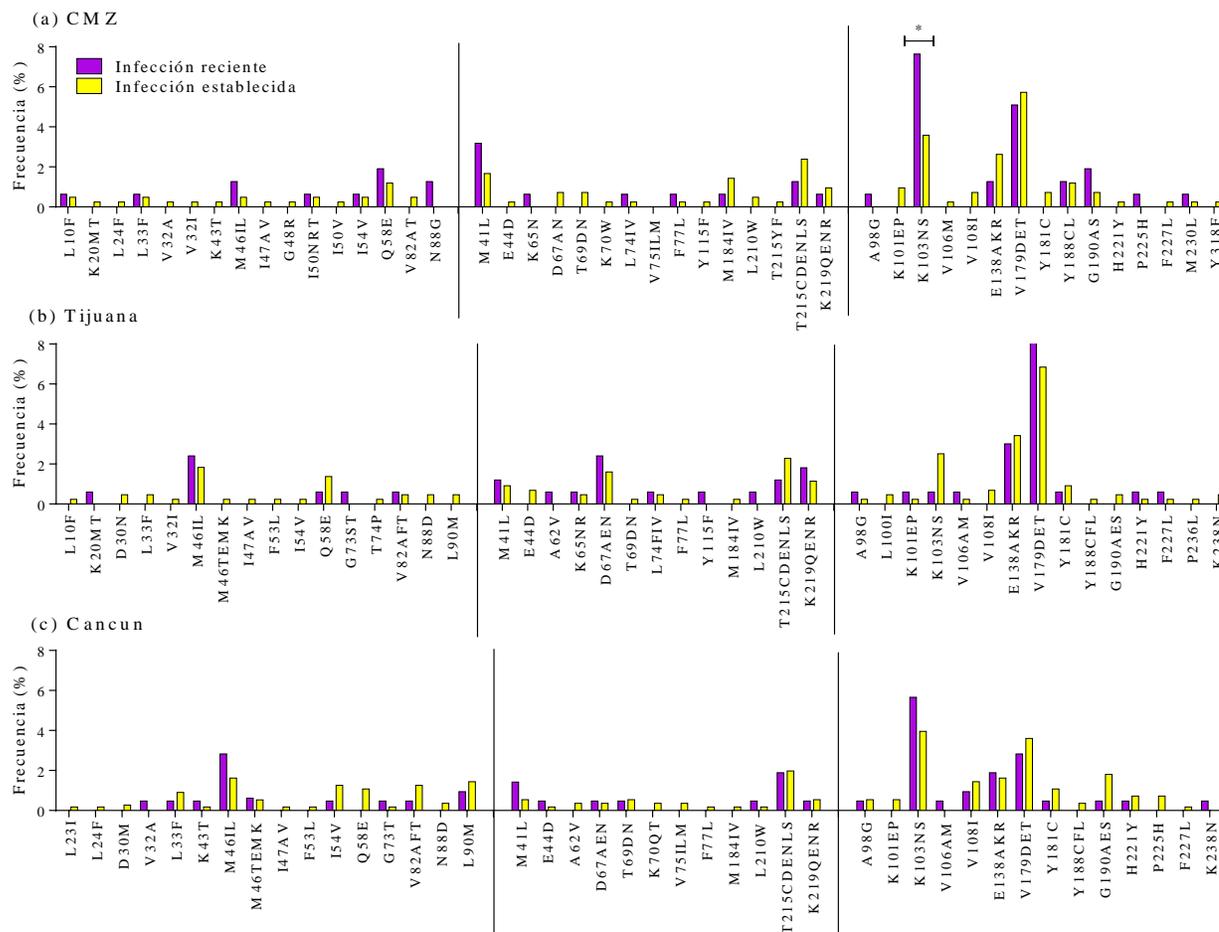


Figura 22. Frecuencia de mutaciones asociadas con resistencia a antirretrovirales en individuos con infección reciente o establecida. Se incluyeron todas las DRM consideradas en la herramienta HIVdb (v.8.3) de la universidad de Stanford, mostrando aquellas mutaciones con frecuencia >0 en al menos una región. Se muestran diferencias significativas en frecuencias ($p<0.05$, prueba de exacta de Fisher). Infección reciente fue definida como con menos de 130 días usando el algoritmo descrito en métodos. CMZ, Central Metropolitan Zone.

Transmisión de virus con resistencia a antirretrovirales

Los árboles filogenéticos permiten la identificación de clusters (grupos de secuencias) con alguna característica en particular. Para caracterizar la transmisión de virus con resistencia a ARV, se construyeron árboles filogenéticos con las secuencias virales obtenidas. En los árboles se identificaron clusters verdaderos usando la herramienta cluster picker usando un umbral de distancia genética de $\geq 1.5\%$ y se colorearon las secuencias virales con resistencia a antirretrovirales.

Primero, se construyó un árbol filogenético con todas las secuencias incluidas en el estudio para ver si las secuencias virales se agrupaban por zona geográfica. En el árbol se observó que muchas de las secuencias tienden a agruparse en clusters dependiendo de la zona geográfica (121 clusters)(Figura 23), aunque también se encontraron algunos clusters intermezclados entre las zonas (14 clusters).

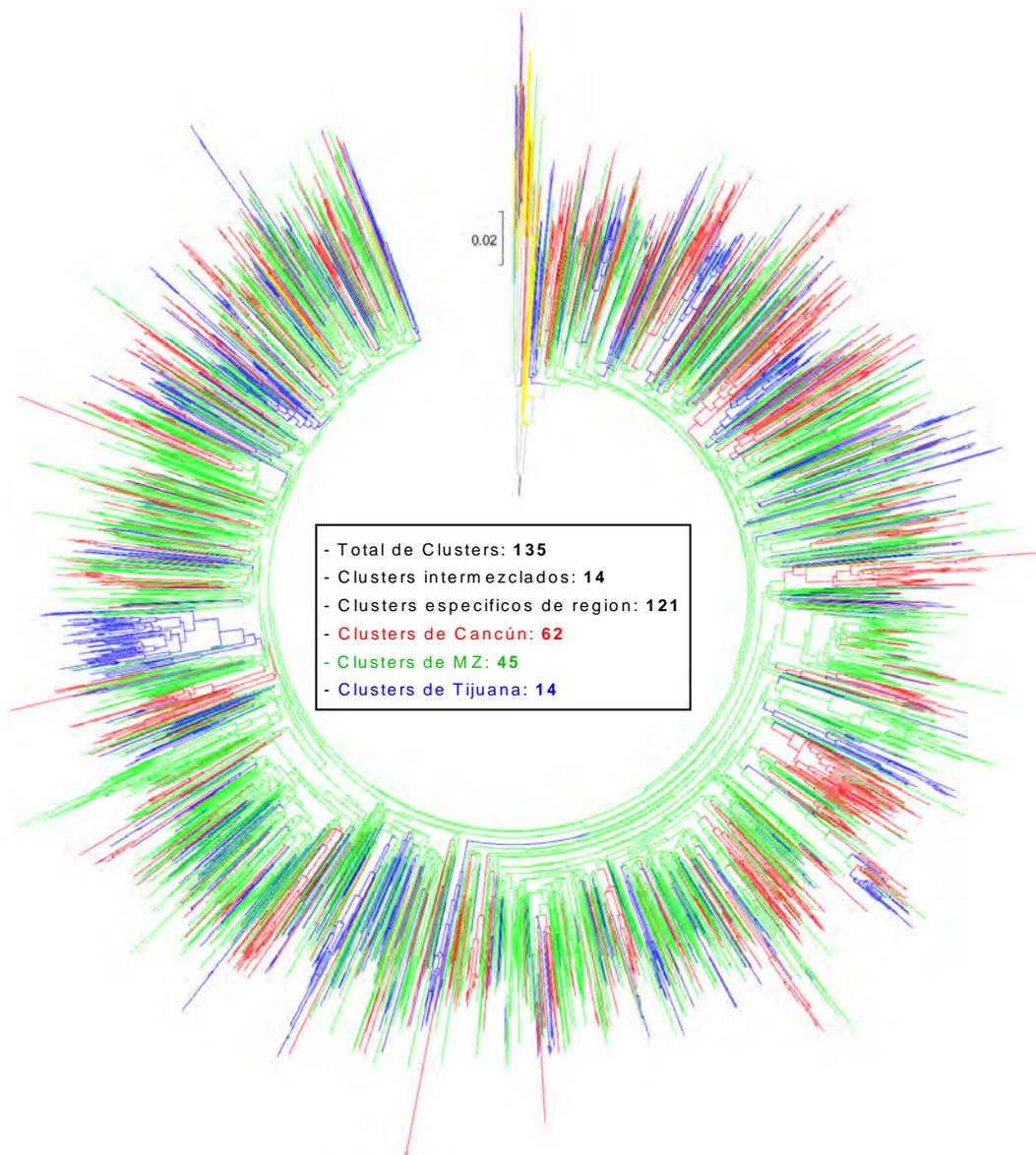


Figura 23. Árbol filogenético de secuencias virales incluidas en todo el estudio. Las secuencias se alinearon usando ClustalW en Mega v.6 y se les removieron los codones asociados con resistencia. Los árboles se construyeron usando Maximun Likelihood con el modelo de sustitución de nucleótidos GTR+Γ+I en la herramienta FastTree 2.1.9. Los clusters fueron identificados usando Cluster Picker con $\geq 1.5\%$ como umbral de distancia genética. En el árbol, cada línea representa una secuencia. **Amarillo**, secuencias de referencia obtenidas de la base de los Alamos. **rojo**, secuencias de Cancún; **verde**, secuencias de la Zona Metropolitana; y **azul oscuro**, secuencias de Tijuana.

Se encontraron 14 clusters (2-3 secuencias) intermezclados entre zonas geográficas. El 64% (9/14) de los clusters estuvieron compuestos de hombres únicamente, donde al menos un hombre se identificó como hombre que tiene sexo con hombres. El 64% (9/14) de los clusters incluyeron al menos una persona con infección reciente. Tres clusters tuvieron al menos un virus resistente a antirretrovirales (Figura 24).

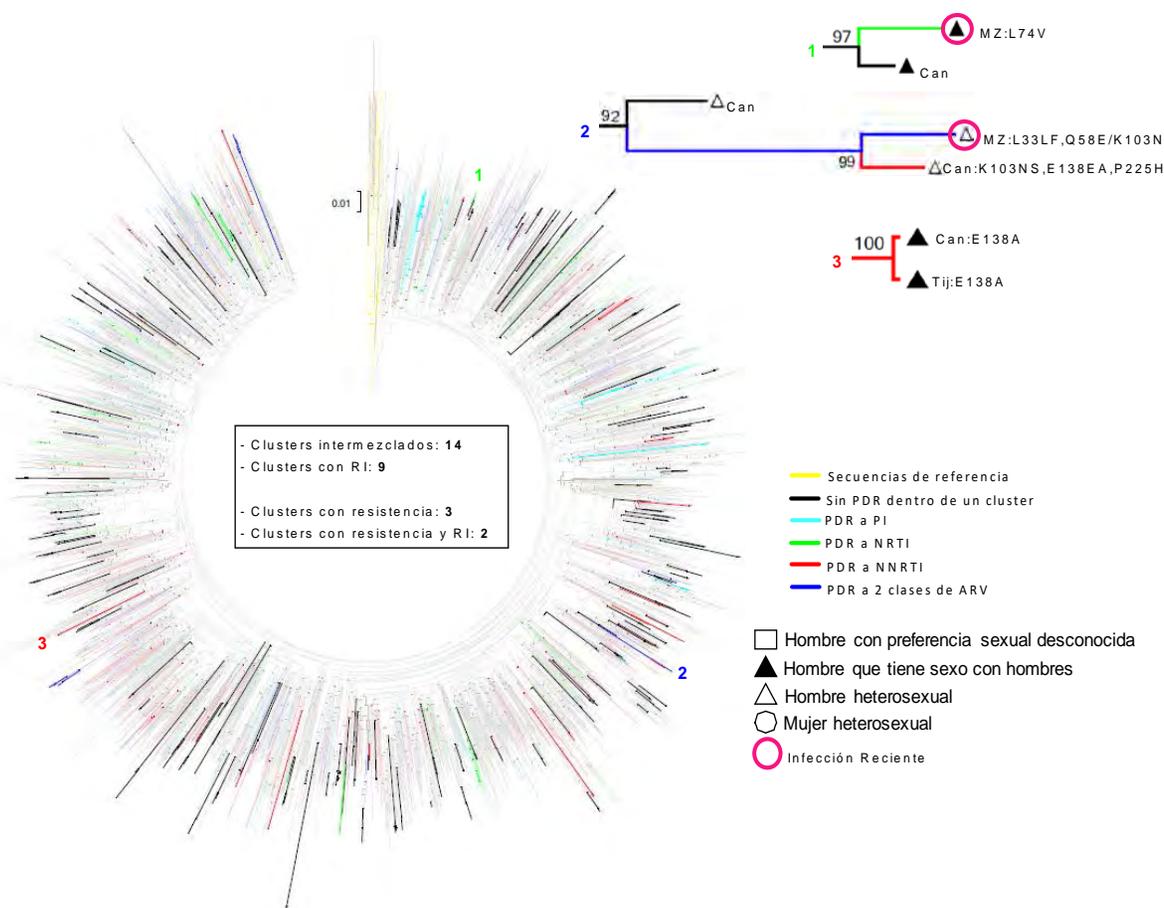


Figura 24. Árbol filogenético de secuencias virales de individuos de la corte completa. Las secuencias se alinearon usando ClustalW en Mega v.6 y se les removieron los codones asociados con resistencia. Los árboles se construyeron usando Maximum Likelihood con el modelo de sustitución de nucleótidos GTR+Γ+I en la herramienta FastTree 2.1.9. Los clusters fueron identificados usando Cluster Picker con $\geq 1.5\%$ como umbral de distancia genética. En el árbol, cada línea representa una secuencia. **Amarillo**, secuencias de referencia obtenidas de la base de los Alamos. **Negro**, secuencias de virus no resistentes dentro de un cluster; **azul claro**, virus resistentes a PI; **rojo**, virus resistentes a NNRTI; **verde**, virus resistentes a NRTIs; y **azul oscuro**, virus resistentes a dos clases de ARV. NNRTI, Inhibidores no análogos de nucleósidos de la RT; NRTI, Inhibidores análogos de nucleósidos de la RT; PI, Inhibidores de proteasa.

Se encontraron 121 clusters (2-6 secuencias) específicos de zona geográfica, de los cuales, 15% (19/121) contenían tres o más secuencias. El 75.8% (95/121) de los clusters estuvieron compuestos únicamente por hombres y 61.2% (74/121) incluyeron al menos un hombre autoidentificado como

hombre que tiene sexo con hombres. Cancún mostró la mayor cantidad de clusters (51.2%, 62/121), seguido de la Zona Metropolitana (37.25, 45/121) y Tijuana (11.6%, 14/121).

Del total de los clusters, en 88% (107/121) incluyeron personas a las que se les hizo determinación de infección reciente o establecida. De estos clusters, el 62% (66/107) tuvieron al menos una secuencia viral procedente de una persona con infección reciente. En Cancún, 65% (40/62) clusters tuvieron al menos una secuencia viral procedente de una persona con infección reciente, en la Zona Metropolitana, 63 % (21/33) y en Tijuana 41% (5/12).

En total, se encontraron 28.1% (34/121) clusters con al menos un virus con PDR. De estos clusters, 13.2% (16/121) contenían virus resistentes a NNRTIs, 5.8%(7/121) a NRTIs, 6.6%(8/121) a PIs, y 2.5%(3/121) a dos clases de antirretrovirales.

Del total de clusters con virus resistentes, Cancún tuvo la mayor cantidad (55.8%, 19/34), seguido de la Zona Metropolitana (29.4%, 10/34) y Tijuana (14.7%, 5/34) (Figura 25-27).

Del total de clusters con virus resistentes, 82.4% (28/34) incluyeron solo hombres. Clusters conteniendo mujeres fueron encontrados en Cancún y Tijuana, pero no en la Zona Metropolitana. Las mutaciones asociadas con resistencia más frecuentes en los clusters fueron: K103N (23.5%, 8/34), E138A (20.5%, 7/34) y M46L/I (17.6%, 6/34). De manera interesante, no se encontraron clusters con K103N en Tijuana (Tabla 4).

En la Zona Metropolitana, 22% (10/45) de los clusters tenían al menos un virus con resistencia (Figura 25), de los cuales, 4%(2/45) tenían virus resistentes a PIs, 11% (5/45) a NNRTIs y 6% (3/445) a NRTIs. Todos los clusters estuvieron compuestos por hombres. En la Zona Metropolitana, 70% (7/10) de los clusters con virus resistente, incluyeron al menos una persona con infección reciente, todos ellos hombres.

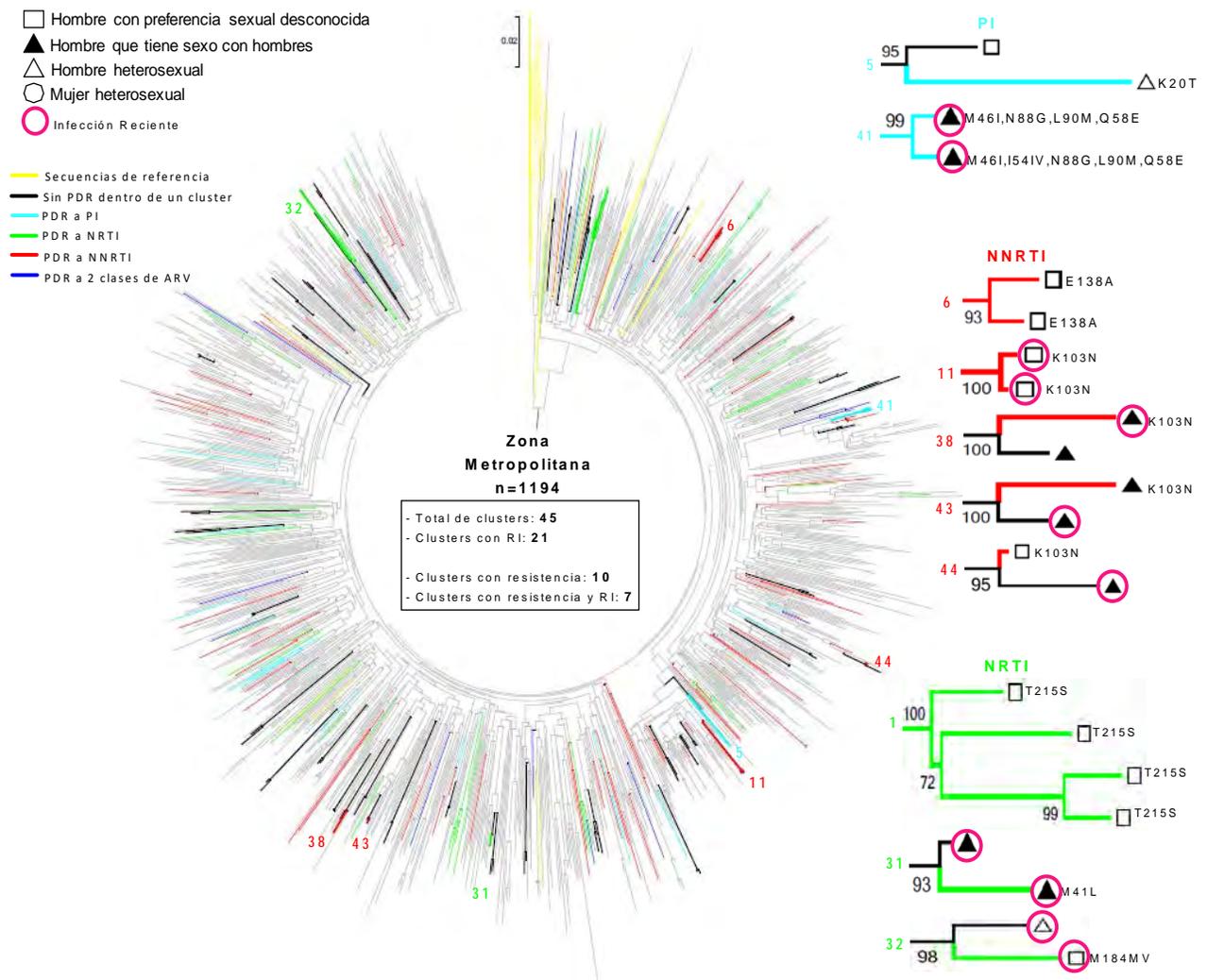


Figura 25. Árbol filogenético de secuencias virales de individuos de la Zona Metropolitana. Las secuencias se alinearon usando ClustalW en Mega v.6 y se les removieron los codones asociados con resistencia. Los árboles se construyeron usando Maximum Likelihood con el modelo de sustitución de nucleótidos GTR+Γ+I en la herramienta FastTree 2.1.9. Los clusters fueron identificados usando Cluster Picker con $\geq 1.5\%$ como umbral de distancia genética. En el árbol, cada línea representa una secuencia. **Amarillo**, secuencias de referencia obtenidas de la base de los Alamos. **Negro**, secuencias de virus no resistentes dentro de un cluster; **azul claro**, virus resistentes a PI; **rojo**, virus resistentes a NNRTI; **verde**, virus resistentes a NRTIs; y **azul oscuro**, virus resistentes a dos clases de ARV. NNRTI, Inhibidores no análogos de nucleósidos de la RT; NRTI, Inhibidores análogos de nucleósidos de la RT; PI, Inhibidores de proteasa.

En Tijuana, 35%(5/14) de los clusters tenían virus resistentes (Figura 26), de los cuales 7% (1/14) tenía resistencia a PI, 21% (3/14) a NNRTIs y 7% (1/14) a NRTIs. Los clusters fueron mezclados entre hombres y mujeres. En Tijuana, 60% (3/5) de los clusters con virus resistentes, incluyeron al menos una persona con infección reciente.

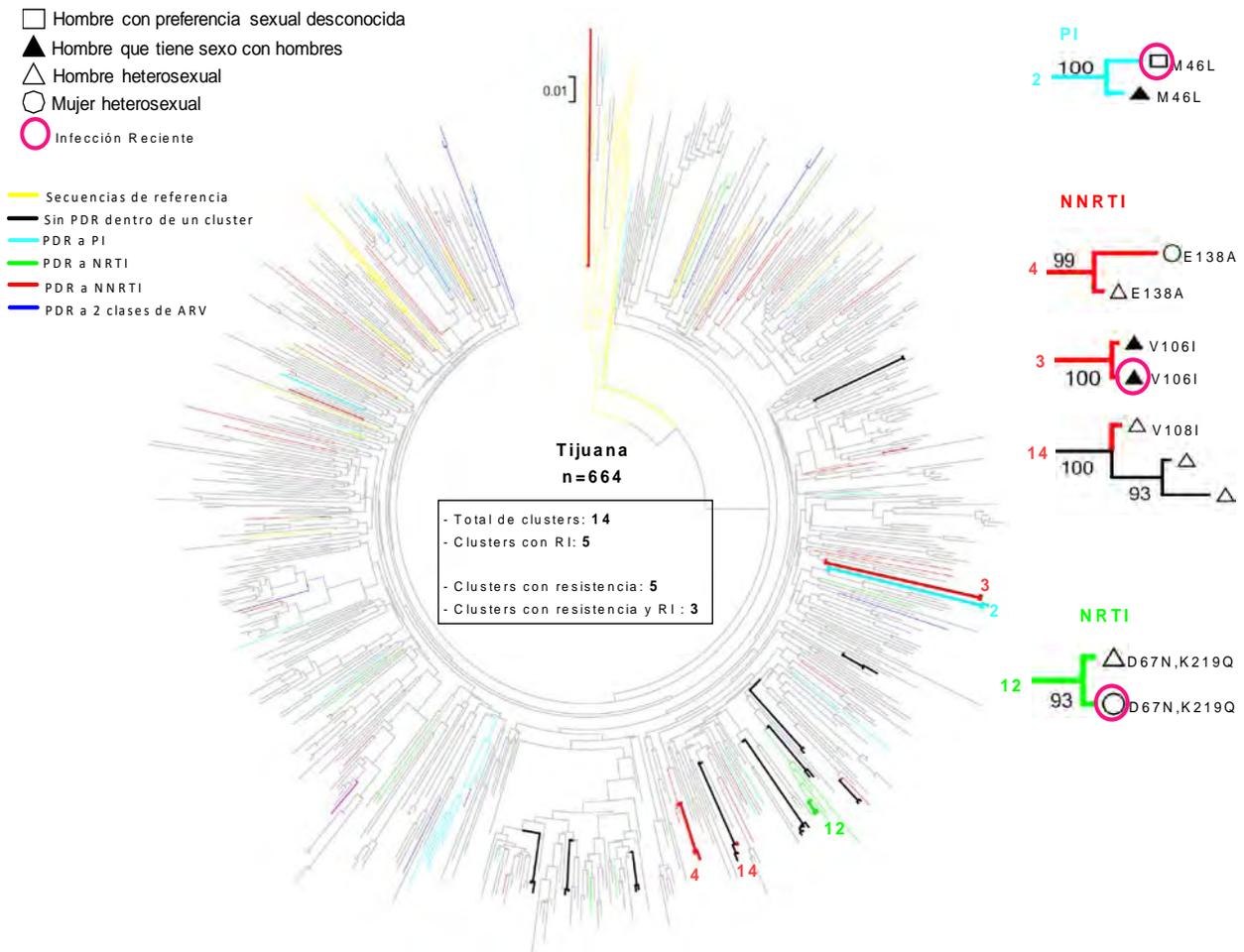


Figura 26. Árbol filogenético de secuencias virales de individuos de Tijuana. Las secuencias se alinearon usando ClustalW en Mega v.6 y se les removieron los codones asociados con resistencia. Los árboles se construyeron usando Maximun Likelihood con el modelo de sustitución de nucleótidos GTR+ Γ +I en la herramienta FastTree 2.1.9. Los clusters fueron identificados usando Cluster Picker con $\geq 1.5\%$ como humbral de distancia genética. En el árbol, cada línea representa una secuencia. **Amarillo**, secuencias de referencia obtenidas de la base de los Alamos. **Negro**, secuencias de virus no resistentes dentro de un cluster; **azul claro**, virus resistentes a PI; **rojo**, virus resistentes a NNRTI; **verde**, virus resistentes a NRTIs; y **azul oscuro**, virus resistentes a dos clases de ARV. NNRTI, Inhibidores no análogos de nucleósidos de la RT; NRTI, Inhibidores análogos de nucleósidos de la RT; PI, Inhibidores de proteasa.

En Cancún, el 30%(19/62) de los clusters tenían al menos un virus resistente (Figura 27), de los cuales, 8% (5/52) tenían virus resistentes a PIs, 12% (8/62) a NNRTIs y 4% (4/562) a NRTIs y 4% (4/62) a dos clases. Los clusters estuvieron compuestos en su mayoría por hombres, generalmente hombres que tienen sexo con hombres. Únicamente 5 clusters estuvieron mezclados entre hombres y mujeres. En Cancún, 68% (13/19) de los clusters con virus resistentes, incluyeron al menos una persona con infección reciente, hombres la mayoría de ellos.

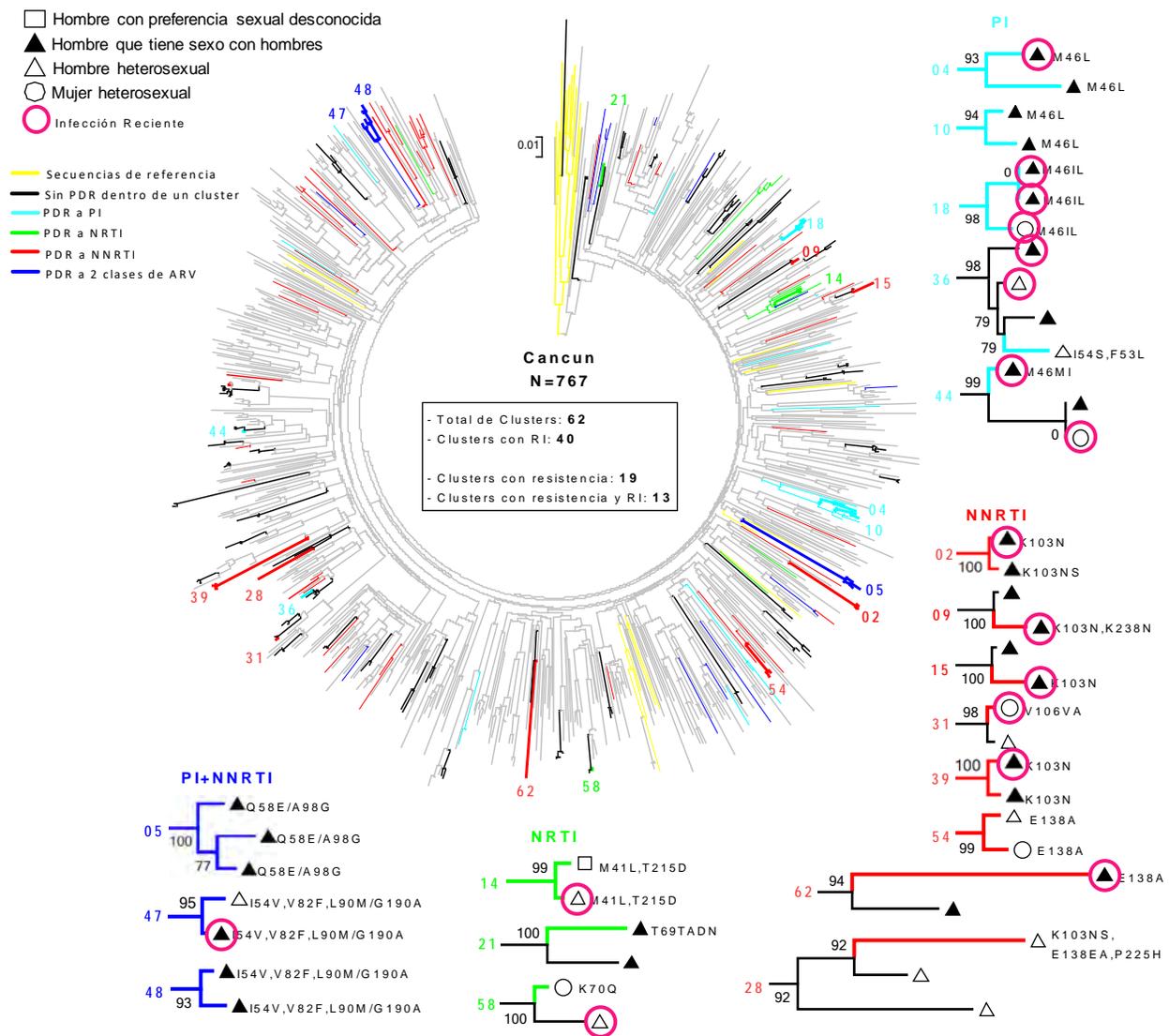


Figura 27. Árbol filogenético de secuencias virales de individuos de Cancún. Las secuencias se alinearon usando ClustalW en Mega v.6 y se les removieron los codones asociados con resistencia. Los árboles se construyeron usando Maximun Likelihood con el modelo de sustitución de nucleótidos GTR+Γ+I en la herramienta FastTree 2.1.9. Los clusters fueron identificados usando Cluster Picker con $\geq 1.5\%$ como humbral de distancia genética. En el árbol, cada línea representa una secuencia. **Amarillo**, secuencias de referencia obtenidas de la base de los Alamos. **Negro**, secuencias de virus no resistentes dentro de un cluster; **azul claro**, virus resistentes a PI; **rojo**, virus resistentes a NNRTI; **verde**, virus resistentes a NRTIs; y **azul oscuro**, virus resistentes a dos clases de ARV. NNRTI, Inhibidores no análogos de nucleósidos de la RT; NRTI, Inhibidores análogos de nucleósidos de la RT; PI, Inhibidores de proteasa.

Estos resultados sugieren transmisión de virus resistentes en diferentes modos de transmisión principalmente dentro de una misma zona geográfica, en Tijuana tiende a prevalecer más la transmisión heterosexual, mientras que en la Zona Metropolitana es más entre hombres. Por tanto, realizar estudios por región geográfica puede ayudar no solo a identificar diferencias en prevalencias de resistencia sino también en la identificación de modos de transmisión.

VI. DISCUSIÓN

En seguimiento a la encuesta con representatividad nacional que se llevó a cabo en 2015, siguiendo los criterios de la OMS,⁵⁴ el objetivo principal del presente estudio fue determinar la prevalencia de resistencia pretratamiento y su incremento en el tiempo en tres zonas geográficas de México: Tijuana, la Zona Metropolitana del Centro y Cancún que son críticas en la epidemia de VIH en México.

La elección del primer esquema de tratamiento para las personas con VIH es decisiva para producir una buena y duradera respuesta contra el virus. Las actuales guías para el uso de los ARV en México recomiendan el uso de esquemas de tratamiento basados en EFV,⁷⁷ como recomiendan las guías de la OMS y como todavía es la opción ampliamente usada en países en vías de desarrollo.⁴⁶ En México, más del 80% de las personas con VIH iniciaron tratamiento con esquemas basados en EFV para 2016 (Figura 10).^{75, 76}

En México, el programa Nacional de VIH ha tenido éxito en procurar el inicio de tratamiento para todas las personas diagnosticadas con VIH y ligándolas al servicio clínico. Para fines de 2016, había más de 127,000 personas con tratamiento ARV en México. Sin embargo, por diversos factores, en diversos puntos del país existen desigualdades en algunos indicadores tempranos asociados con resistencia. Los indicadores tempranos en los que se han observado las mayores desigualdades en México son: retención en la atención a los 12 meses, proporción de personas que logran suprimir la carga viral a los 12 meses y, de la mano, cobertura de la carga viral.⁷⁶

Considerando este escenario de desigualdades, y considerando la complejidad y el costo de la implementación de una política nacional de salud en respuesta a los altos niveles de resistencia observados (incluyendo cambio a esquemas de primera vez basados en DTG o realizando pruebas de resistencia para todas las personas que inician tratamiento ARV), el Programa Nacional de Salud ha propuesto posibles estrategias localizadas, por ejemplo encuestas subnacionales, para responder a la resistencia donde la urgencia podría ser mayor.

Aunque nuestro estudio tiene limitaciones al ser retrospectivo y hacer muestreo por conveniencia, el tiempo de reclutamiento (9 años) y la alta densidad muestreada en los centros de referencia en cada zona hacen fuertes nuestras observaciones. En el caso de Tijuana, la vigilancia se realizó en el segundo centro de referencia de VIH más grande de la Ciudad. En Cancún, el estudio se realizó en el centro más grande de la Ciudad y de Quintana Roo. Para la Zona Metropolitana, se incluyeron clínicas en las que el 23% de las personas iniciaron tratamiento en 2016, del total del país

Considerando el periodo de estudio en el que el reclutamiento de pacientes fue constante para las tres zonas (2012-2016), observamos prevalencias similares de PDR a cualquier antirretroviral en cada una (13.4% para la Zona Metropolitana, 8.9% para Tijuana y 11.2% para Cancún) con una clara predominancia de PDR a NNRTI (8.7%, 4.8% y 8.1%, respectivamente). Estos resultados concuerdan con la encuesta con representatividad nacional que también mostró alta prevalencia de resistencia pretratamiento (16%) asociada con resistencia a NNRTI (11%).⁵⁴ Los resultados del presente estudio también concuerdan con resultados obtenidos en otras encuestas nacionales realizadas en Latinoamérica, donde se han reportado prevalencias similares de resistencia. Argentina reportó resistencia pretratamiento a cualquier ARV de 13% y 10% de resistencia a NNRTIs,⁷³ mientras que Guatemala reportó resistencia pretratamiento de 14.1% y 12.0% resistencia a NNRTIs.⁷⁴

Por otro lado, nuestro estudio mostró diferencias en prevalencia de resistencia a clases de antirretrovirales en particular en las zonas geográficas. En Tijuana hubo una menor prevalencia de resistencia a NNRTIs ($p < 0.05$) y también menor frecuencia de la mutación K103NS ($p < 0.005$) respecto a Cancún y la Zona Metropolitana. Sin embargo, aun cuando la prevalencia de PDR a NNRTI en Tijuana fue más baja que en la Zona Metropolitana, un claro incremento de PDR a NNRTI en el tiempo fue observado en ambas zonas durante los 9 años de reclutamiento. Estas observaciones apoyan los hallazgos previos en Latinoamérica y el Caribe, así como en países específicos de la región, en donde se muestra un incremento de resistencia pretratamiento a NNRTI debido al uso diseminado de esquemas de tratamiento de primera vez basados en efavirenz y nevirapina.⁶⁸⁻⁷⁰

Además, aunque el incremento de PDR a NNRTI no fue significativo en Cancún, sí se observó un incremento de resistencia efavirenz en las tres zonas, alcanzando 11.8% en la Zona Metropolitana, 6.1% en Tijuana y 8.3% en Cancún para 2016. Esos incrementos coincidieron con incremento en frecuencia de virus portando la mutación K103N (especialmente en la Zona Metropolitana). La mutación K103N es seleccionada por el uso de efavirenz y nevirapina, por sí sola confiere alto nivel de resistencia a estos dos fármacos. Además, esta mutación no afecta la capacidad del virus para replicarse, por lo que puede mantenerse por largo tiempo aun en ausencia de tratamiento.^{93, 94} Lo que explica porque no hubo diferencias en prevalencia de resistencia pretratamiento en personas con infección reciente contra infección establecida.

Por otra parte, el incremento en frecuencia de K103N fue más baja en Tijuana, consistente con un nivel de resistencia más baja a efavirenz. Justamente, evidencia de transmisión de clusters con K103N fue observado en La Zona Metropolitana y Cancún, pero no en Tijuana. Incluso, cuando el incremento no fue significativo, la prevalencia de TAMs en Tijuana alcanzó niveles más altos que en

la Zona Metropolitana y Cancún en 2016 (7.3% contra 0% y 0.4%, $p < 0.0001$). Esto podría sugerir diferentes prácticas en la prescripción de ARV (otro de los indicadores tempranos para resistencia) en Tijuana comparado con Cancún o la Zona Metropolitana.

Aun cuando los niveles de resistencia a efavirnez pueden variar entre zonas, la evidencia sugiere incremento significativo en el tiempo que debe ser considerado al tomar decisiones en salud pública. De manera importante, las características demográficas y clínicas entre las tres zonas estudiadas mostraron diferencias importantes. Como se esperaba, se observaron más IDUs, mujeres y heterosexuales en Tijuana comparado con la Zona Metropolitana y Cancún. Tijuana también mostró menores proporciones de personas empleadas y nivel educativo. Incluso, aun cuando no se encontraron diferencias en variables clínicas ni demográficas en personas con y sin PDR en ninguna de las zonas, esas diferencias generales entre las zonas, sugiere importantes diferencias en poblaciones blanco que podría justificar divergentes estrategias de salud pública en respuesta a la resistencia del VIH a los antirretrovirales.

En la comparación entre personas con infección reciente e infección establecida, es de destacarse que en las tres zonas geográficas se observó una mayor proporción de hombres que tiene sexo con hombres en infección reciente que en infección establecida. Esto sugiere que los hombres que tienen sexo con hombres acuden más pronto al diagnóstico de VIH, principalmente en la Zona Metropolitana. Asimismo, aunque no hubo diferencias en las prevalencias de resistencia entre personas con infección reciente o establecida durante el periodo analizado, si se observó que en la Zona Metropolitana hubo incremento de resistencia a NNRTIs en personas con infección reciente, lo que apoya la idea de que, en la Zona Metropolitana las personas acuden más tempranamente al diagnóstico. Por otra parte, es interesante observar que, en las tres zonas geográficas, más del 60% de los clusters incluyeron al menos una persona con infección reciente, lo que claramente demuestra que los virus resistentes están siendo transmitidos, principalmente entre hombres.

De manera importante, clusters de virus con PDR incluyendo mujeres fueron solo encontrados en Tijuana y Cancún, pero no en la Zona Metropolitana. Una característica común de las tres zonas fue la llegada tardía a la atención clínica y el consecuente inicio tardía de la terapia antirretroviral, como reportado previamente en México.⁹⁵

Por último, en México parece haber una regionalización de la epidemia al observar agrupamiento de secuencias por región, con diferencias en prevalencias de resistencia y diferentes modos de Aunque es sabido que la falta de adherencia al tratamiento es la principal causa del surgimiento de virus resistentes a los antirretrovirales en personas que toman tratamiento (resistencia adquirida) y que estos virus resistentes pueden ser transmitidos y permanecer por largo tiempo en personas sin tratamiento previo (resistencia transmitida),^{25, 46, 96-98} es importante mencionar que existen otras

causas por las que pueden surgir virus resistentes. Dentro de estas causas podemos mencionar la combinación inadecuada de fármacos o a la presencia de niveles de fármaco insuficiente asociada a diferencias en metabolismo, problemas de absorción o penetración insuficiente en zonas anatómicas específicas.^{99, 100} Asimismo, la selección de mutaciones de resistencia podría asociarse en algunos casos específicos a la presión inmune del hospedero, en particular la selección por respuestas restringidas por los genes HLA.¹⁰¹⁻¹⁰³ Así, mutaciones de resistencia a fármacos antirretrovirales, teóricamente podrían también funcionar como mutaciones de escape inmune asociadas a alelos HLA específicos y seleccionarse en personas con el alelo relevante, aún sin la presencia del fármaco selector. En estos casos, las mutaciones suelen presentarse como polimorfismos con mayor frecuencia en ciertos subtipos virales o poblaciones particulares.^{103, 104} Sin embargo, es importante mencionar que estudios recientes de nuestro grupo de investigación han evidenciado que en población mexicana (así como poblaciones de Canadá y Estados Unidos), infectada predominantemente por virus de subtipo B, el traslape de la presión selectiva por fármacos antirretrovirales y de la presión selectiva inmune es mínimo.¹⁰⁵ De cualquier manera, existen algunas excepciones dignas de mencionarse como los polimorfismos de la posición E138 de la transcriptasa inversa, asociados simultáneamente a presión selectiva por rilpivirina y a presión por respuesta inmune restringida por HLA B*18,¹⁰⁶ que han llevado al enriquecimiento de estos polimorfismos en poblaciones con altas frecuencias de dicho alelo HLA, aún sin la presencia de presión selectiva por el fármaco.

En conclusión, nuestro estudio sugiere escenarios diferentes sobre PDR en tres zonas importantes de la epidemia de VIH en México, con poblaciones con diferentes características demográficas, diferente dinámica en la transmisión del VIH y bajos niveles de PDR a NNRTI en Tijuana con parado con Cancún y la Zona Metropolitana. Sin embargo, incremento de resistencia a EFV en el tiempo observada en las tres zonas, sugiere que una estrategia nacional para responder a los altos niveles de PDR puede eventualmente ser justificada.

VII. REFERENCIAS

1. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E *et al.* Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 1984; **224**: 497-500.
2. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; **220**: 868-71.
3. UNAIDS. HIV/AIDS. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>.
4. WHO. HIV/AIDS Data and statistics. <http://www.who.int/hiv/data/en/>.
5. UNAIDS. AIDSinfo. <http://aidsinfo.unaids.org/>.
6. Censida. Boletín de Atención Integral de Personas con VIH 2017. Enero-marzo. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/226743/Boletin_Nal_CENSIDA_AT_IN_ene_mar_2017.pdf.
7. Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* 1999; **285**: 1-32.
8. Wang WK, Chen MY, Chuang CY *et al.* Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. *J Microbiol Immunol Infect* 2000; **33**: 131-40.
9. Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol* 2012; **10**: 279-90.
10. Peterlin BM, Trono D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 97-107.
11. Krogstad P. Molecular biology of the human immunodeficiency virus: current and future targets for intervention. *Semin Pediatr Infect Dis* 2003; **14**: 258-68.
12. H.M. Berman JW, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. The Protein Data Bank.
13. Becerra JC, Bildstein LS, Gach JS. Recent Insights into the HIV/AIDS Pandemic. *Microb Cell* 2016; **3**: 451-75.
14. G. A-RSR-T. Virología del VIH: buscando nuevas estrategias antirretrovirales. In: Censida SdS, ed. *25 años de SIDA en México Logros, desaciertos y retos*. México: Secretaría de Salud, 2009; 135-60.
15. Simon V, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: implications for therapy. *Nat Rev Microbiol* 2003; **1**: 181-90.
16. Wilen CB, Tilton JC, Doms RW. HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; **2**.
17. Campbell EM, Hope TJ. HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol* 2015; **13**: 471-83.
18. Hu WS, Hughes SH. HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; **2**.
19. Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; **2**: a007161.
20. Lusic M, Siliciano RF. Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. *Nat Rev Microbiol* 2017; **15**: 69-82.
21. Karn J, Stoltzfus CM. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; **2**: a006916.
22. Guerrero S, Batisse J, Libre C *et al.* HIV-1 replication and the cellular eukaryotic translation apparatus. *Viruses* 2015; **7**: 199-218.

23. Freed EO. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol* 2015; **13**: 484-96.
24. Pau AK, George JM. Antiretroviral therapy: current drugs. *Infect Dis Clin North Am* 2014; **28**: 371-402.
25. Clutter DS, Jordan MR, Bertagnolio S *et al.* HIV-1 drug resistance and resistance testing. *Infect Genet Evol* 2016; **46**: 292-307.
26. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med* 2012; **18**: 182-92.
27. Santoro MM, Perno CF. HIV-1 Genetic Variability and Clinical Implications. *ISRN Microbiol* 2013; **2013**: 481314.
28. Smyth RP, Negroni M. A step forward understanding HIV-1 diversity. *Retrovirology* 2016; **13**: 27.
29. Das K, Arnold E. HIV-1 reverse transcriptase and antiviral drug resistance. Part 1. *Curr Opin Virol* 2013; **3**: 111-8.
30. Smyth RP, Davenport MP, Mak J. The origin of genetic diversity in HIV-1. *Virus Res* 2012; **169**: 415-29.
31. Lal RB, Chakrabarti S, Yang C. Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development. *Indian J Med Res* 2005; **121**: 287-314.
32. Hemelaar J. Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic. *J Infect* 2013; **66**: 391-400.
33. Requejo HI. Worldwide molecular epidemiology of HIV. *Rev Saude Publica* 2006; **40**: 331-45.
34. Fauci AS, Pantaleo G, Stanley S *et al.* Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med* 1996; **124**: 654-63.
35. An P, Winkler CA. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends Genet* 2010; **26**: 119-31.
36. Munawwar A, Singh S. Human Herpesviruses as Copathogens of HIV Infection, Their Role in HIV Transmission, and Disease Progression. *J Lab Physicians* 2016; **8**: 5-18.
37. Lewthwaite P, Wilkins E. Natural history of HIV/AIDS. *Medicine*; **37**: 333-7.
38. Deeks SG, Lewin SR, Havlir DV. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *Lancet* 2013; **382**: 1525-33.
39. Nakagawa F, Lodwick RK, Smith CJ *et al.* Projected life expectancy of people with HIV according to timing of diagnosis. *AIDS* 2012; **26**: 335-43.
40. Teeraananchai S, Kerr SJ, Amin J *et al.* Life expectancy of HIV-positive people after starting combination antiretroviral therapy: a meta-analysis. *HIV Med* 2017; **18**: 256-66.
41. Iyidogan P, Anderson KS. Current perspectives on HIV-1 antiretroviral drug resistance. *Viruses* 2014; **6**: 4095-139.
42. Menendez-Arias L. Molecular basis of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance: overview and recent developments. *Antiviral Res* 2013; **98**: 93-120.
43. Vella S, Schwartlander B, Sow SP *et al.* The history of antiretroviral therapy and of its implementation in resource-limited areas of the world. *AIDS* 2012; **26**: 1231-41.
44. Cihlar T, Fordyce M. Current status and prospects of HIV treatment. *Curr Opin Virol* 2016; **18**: 50-6.
45. Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC *et al.* Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998; **338**: 853-60.

46. WHO. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK374294/pdf/Bookshelf_NBK374294.pdf.
47. WHO. Consolidated guidelines on HIV prevention, diagnosis, treatment and care for key populations. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*. France: UNAIDS, 2016; 1-480.
48. Le T, Wright EJ, Smith DM *et al*. Enhanced CD4+ T-cell recovery with earlier HIV-1 antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 2013; **368**: 218-30.
49. Walker BD, Hirsch MS. Antiretroviral therapy in early HIV infection. *N Engl J Med* 2013; **368**: 279-81.
50. UNAIDS. Global HIV Statistics. <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>.
51. WHO. Policy brief: consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: what's new. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*. Geneva: UNAIDS, 2015; 1-20.
52. UNAIDS. Global report on early warning indicator of HIV drug resistance. Geneva, Switzerland: UNAIDS, 2016.
53. WHO. First-line ART for adults. <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/arv2013/art/artadults/en/>.
54. Avila-Rios S, Garcia-Morales C, Matias-Florentino M *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**: e579-e91.
55. Eaton JW, Johnson LF, Salomon JA *et al*. HIV treatment as prevention: systematic comparison of mathematical models of the potential impact of antiretroviral therapy on HIV incidence in South Africa. *PLoS Med* 2012; **9**: e1001245.
56. Wittkop L, Gunthard HF, de Wolf F *et al*. Effect of transmitted drug resistance on virological and immunological response to initial combination antiretroviral therapy for HIV (EuroCoord-CHAIN joint project): a European multicohort study. *Lancet Infect Dis* 2011; **11**: 363-71.
57. Hamers RL, Schuurman R, Sigaloff KC *et al*. Effect of pretreatment HIV-1 drug resistance on immunological, virological, and drug-resistance outcomes of first-line antiretroviral treatment in sub-Saharan Africa: a multicentre cohort study. *Lancet Infect Dis* 2012; **12**: 307-17.
58. UNAIDS. HIV DRUG RESISTANCE REPORT 2017. Geneva, Switzerland: unaids, 2017.
59. Trotter AB, Hong SY, Srikantiah P *et al*. Systematic review of HIV drug resistance in Southeast Asia. *AIDS Rev* 2013; **15**: 162-70.
60. WHO. SURVEILLANCE OF HIV DRUG RESISTANCE IN ADULTS INITIATING ANTIRETROVIRAL THERAPY (PRETREATMENT HIV DRUG RESISTANCE). Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2014.
61. Lavu E, Kave E, Mosoro E *et al*. High Levels of Transmitted HIV Drug Resistance in a Study in Papua New Guinea. *PLoS One* 2017; **12**: e0170265.
62. Avila-Rios S, Garcia-Morales C, Garrido-Rodriguez D *et al*. HIV-1 drug resistance surveillance in antiretroviral treatment-naive individuals from a reference hospital in Guatemala, 2010-2013. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2015; **31**: 401-11.
63. Avila-Rios S, Garcia-Morales C, Tapia-Trejo D *et al*. HIV Drug Resistance Surveillance in Honduras after a Decade of Widespread Antiretroviral Therapy. *PLoS One* 2015; **10**: e0142604.
64. Avila-Rios S, Garcia-Morales C, Matias-Florentino M *et al*. HIV Drug Resistance in Antiretroviral Treatment-Naive Individuals in the Largest Public Hospital in Nicaragua, 2011-2015. *PLoS One* 2016; **11**: e0164156.

-
65. Mendoza Y, Castillo Mewa J, Martinez AA *et al.* HIV-1 Antiretroviral Drug Resistance Mutations in Treatment Naive and Experienced Panamanian Subjects: Impact on National Use of EFV-Based Schemes. *PLoS One* 2016; **11**: e0154317.
 66. Gagliardo C, Brozovich A, Birnbaum J *et al.* A multicenter study of initiation of antiretroviral therapy and transmitted drug resistance in antiretroviral-naive adolescents and young adults with HIV in New York City. *Clin Infect Dis* 2014; **58**: 865-72.
 67. Panichsillapakit T, Smith DM, Wertheim JO *et al.* Prevalence of Transmitted HIV Drug Resistance Among Recently Infected Persons in San Diego, CA 1996-2013. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2016; **71**: 228-36.
 68. Avila-Rios S, Sued O, Rhee SY *et al.* Surveillance of HIV Transmitted Drug Resistance in Latin America and the Caribbean: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 2016; **11**: e0158560.
 69. Rhee SY, Blanco JL, Jordan MR *et al.* Geographic and temporal trends in the molecular epidemiology and genetic mechanisms of transmitted HIV-1 drug resistance: an individual-patient- and sequence-level meta-analysis. *PLoS Med* 2015; **12**: e1001810.
 70. Gupta RK, Jordan MR, Sultan BJ *et al.* Global trends in antiretroviral resistance in treatment-naive individuals with HIV after rollout of antiretroviral treatment in resource-limited settings: a global collaborative study and meta-regression analysis. *Lancet* 2012; **380**: 1250-8.
 71. Frentz D, Van de Vijver DA, Abecasis AB *et al.* Increase in transmitted resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors among newly diagnosed HIV-1 infections in Europe. *BMC Infect Dis* 2014; **14**: 407.
 72. Gupta RK, Gregson J, Parkin N *et al.* HIV-1 drug resistance before initiation or re-initiation of first-line antiretroviral therapy in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-regression analysis. *Lancet Infect Dis* 2018; **18**: 346-55.
 73. Bissio E, Barbas MG, Bouzas MB *et al.* Pretreatment HIV-1 drug resistance in Argentina: results from a surveillance study performed according to WHO-proposed new methodology in 2014-15. *J Antimicrob Chemother* 2017; **72**: 504-10.
 74. A. Giron Callejas SA, R. Mendizabal Burastero, C. Garcia Morales, S. Northbrook, G. ReyesTeran, Guatemalan HIVdr Group. HIV pretreatment and acquired drug resistance: results from the first nationally representative survey conducted in Guatemala, 2016. *9th IAS Conference on HIV Science. Paris, France.*
 75. Censida. Boletín de Atención Integral de Personas con VIH 2016, octubre-diciembre 2016. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/195333/Boletin_Nal_CENSIDA_AT_IN_oct_dic_2016.pdf.
 76. Magis-Rodriguez CL. Panorama en México de los Antirretrovirales. *14 Congreso Internacional GEVIHSS IAPAC 2017. Guadalajara, Jalisco, Mexico*, Grupo de Estudios de VIH Sida del Sureste A.C.
 77. Censida. Guía de Manejo Antirretroviral de las Personas con VIH. http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/179552/G_ARV2016_1.pdf.
 78. WHO. GLOBAL HEALTH SECTOR STRATEGY ON HIV 2016–2021 TOWARDS ENDING AIDS. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2016.
 79. UNAIDS. Global action plan on HIV Drug Resistance 2017-2021. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2017.
 80. Goldenberg S, Silverman J, Engstrom D *et al.* "Right Here is the Gateway": Mobility, Sex Work Entry and HIV Risk Along the Mexico-U.S. Border. *Int Migr* 2014; **52**: 26-40.
-

81. Mehta SR, Wertheim JO, Brouwer KC *et al.* HIV Transmission Networks in the San Diego-Tijuana Border Region. *EBioMedicine* 2015; **2**: 1456-63.
82. Zhang X, Martinez-Donate AP, Nobles J *et al.* Substance Use Across Different Phases of the Migration Process: A Survey of Mexican Migrants Flows. *J Immigr Minor Health* 2015; **17**: 1746-57.
83. Zhang X, Martinez-Donate AP, Simon NE *et al.* Risk behaviours for HIV infection among travelling Mexican migrants: The Mexico-US border as a contextual risk factor. *Glob Public Health* 2017; **12**: 65-83.
84. Censida. Vigilancia Epidemiológica de casos de VIH/SIDA en México. http://censida.salud.gob.mx/descargas/epidemiologia/RN_DIA_MUNDIAL_2016a.pdf.
85. Avila-Rios S, Mejia-Villatoro CR, Garcia-Morales C *et al.* Prevalence and patterns of HIV transmitted drug resistance in Guatemala. *Rev Panam Salud Publica* 2011; **30**: 641-8.
86. Zhou Z, Wagar N, DeVos JR *et al.* Optimization of a low cost and broadly sensitive genotyping assay for HIV-1 drug resistance surveillance and monitoring in resource-limited settings. *PLoS One* 2011; **6**: e28184.
87. Konikoff J, Brookmeyer R, Longosz AF *et al.* Performance of a limiting-antigen avidity enzyme immunoassay for cross-sectional estimation of HIV incidence in the United States. *PLoS One* 2013; **8**: e82772.
88. Laeyendecker O, Brookmeyer R, Cousins MM *et al.* HIV incidence determination in the United States: a multiassay approach. *J Infect Dis* 2013; **207**: 232-9.
89. Tamura K, Stecher G, Peterson D *et al.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; **30**: 2725-9.
90. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* 2010; **5**: e9490.
91. Ragonnet-Cronin M, Hodcroft E, Hue S *et al.* Automated analysis of phylogenetic clusters. *BMC Bioinformatics* 2013; **14**: 317.
92. Wertheim JO, Kosakovsky Pond SL, Forgiione LA *et al.* Social and Genetic Networks of HIV-1 Transmission in New York City. *PLoS Pathog* 2017; **13**: e1006000.
93. University S. NNRTI Resistance Notes. <https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/NNRTI/> (april 2017, date last accessed).
94. University S. HIVdb Program. Genotypic Resistance Interpretation Algorithm. <https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-mutations/> (april 2017, date last accessed).
95. Magis-Rodriguez CL, Villafuerte-Garcia A, Cruz-Flores RA *et al.* [Delayed initiation of antiretroviral therapy in Mexico]. *Salud Publica Mex* 2015; **57 Suppl 2**: s127-34.
96. von Wyl V, Klimkait T, Yerly S *et al.* Adherence as a predictor of the development of class-specific resistance mutations: the Swiss HIV Cohort Study. *PLoS One* 2013; **8**: e77691.
97. Paydary K, Khaghani P, Emamzadeh-Fard S *et al.* The emergence of drug resistant HIV variants and novel anti-retroviral therapy. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013; **3**: 515-22.
98. Ndahimana J, Riedel DJ, Mwumvaneza M *et al.* Drug resistance mutations after the first 12 months on antiretroviral therapy and determinants of virological failure in Rwanda. *Trop Med Int Health* 2016; **21**: 928-35.
99. Cortez KJ, Maldarelli F. Clinical management of HIV drug resistance. *Viruses* 2011; **3**: 347-78.
100. Tang MW, Shafer RW. HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications. *Drugs* 2012; **72**: e1-25.

101. Mueller SM, Schaetz B, Eismann K *et al.* Dual selection pressure by drugs and HLA class I-restricted immune responses on human immunodeficiency virus type 1 protease. *J Virol* 2007; **81**: 2887-98.
102. Ahlenstiel G, Roomp K, Daumer M *et al.* Selective pressures of HLA genotypes and antiviral therapy on human immunodeficiency virus type 1 sequence mutation at a population level. *Clin Vaccine Immunol* 2007; **14**: 1266-73.
103. Tschochner M, Chopra A, Maiden TM *et al.* Effects of HIV type-1 immune selection on susceptibility to integrase inhibitor resistance. *Antivir Ther* 2009; **14**: 953-64.
104. Manosuthi W, Butler DM, Perez-Santiago J *et al.* Protease polymorphisms in HIV-1 subtype CRF01_AE represent selection by antiretroviral therapy and host immune pressure. *AIDS* 2010; **24**: 411-6.
105. Soto-Nava M, Avila-Rios S, Valenzuela-Ponce H *et al.* Weaker HLA Footprints on HIV in the Unique and Highly Genetically Admixed Host Population of Mexico. *J Virol* 2018; **92**.
106. Gatanaga H, Brumme ZL, Adland E *et al.* Potential for immune-driven viral polymorphisms to compromise antiretroviral-based preexposure prophylaxis for prevention of HIV-1 infection. *AIDS* 2017; **31**: 1935-43.

HIV pretreatment drug resistance trends in three geographic areas of Mexico

Claudia García-Morales¹, Daniela Tapia-Trejo¹, Verónica S. Quiroz-Morales¹, Samuel Navarro-Álvarez², Carlos A. Barrera-Arellano³, Jesús Casillas-Rodríguez⁴, Karla A. Romero-Mora¹, María Gómez-Palacio-Schjetnan¹, Akio Murakami-Ogasawara¹, Santiago Ávila-Ríos^{1*}† and Gustavo Reyes-Terán¹† on behalf of the HIVDR MexNet Group‡

¹Centre for Research in Infectious Diseases, National Institute of Respiratory Diseases, Calzada de Tlalpan 4502, Colonia Sección XVI, CP 14080 Mexico City, Mexico; ²Hospital General de Tijuana, Av. Centenario 10851, Zona Río, C.P. 22320 Tijuana, B.C., Mexico; ³CAPASITS Cancún. 65, andador 5 entre calle 12 y 13, atrás del Hospital General de Cancún, C.P. 77500 Col. Centro. Cancún, Quintana Roo, Mexico; ⁴Condesa Specialised Clinic, General Benjamín Hill 24, Colonia Condesa, CP 06140 Mexico City, Mexico

*Corresponding author. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Calzada de Tlalpan 4502, Col. Sección XVI, CP 14080 Mexico City, Mexico. Tel/Fax: (+5255) 56667985; E-mail: santiago.avila@cieni.org.mx

†These authors contributed equally to this work.

‡Members of the HIVDR MexNet Group are listed in the Acknowledgements section.

Received 23 May 2017; returned 22 June 2017; revised 7 July 2017; accepted 11 July 2017

Background: Pretreatment drug resistance (PDR) levels to NNRTI approaching 10% have recently been reported in Mexico. However, subnational differences may exist in PDR prevalence and transmission dynamics.

Objectives: We longitudinally assessed HIV PDR in three geographic areas of Mexico.

Patients and methods: HIV-infected, antiretroviral-naive individuals were recruited from 2008 to 2016, from the Central Metropolitan Zone (CMZ), Cancun and Tijuana (1194, 773 and 668 respectively). PDR was estimated using the Stanford HIVdb tool from plasma HIV *pol* sequences.

Results: A higher proportion of females, lower education and lower employment rate were observed in Tijuana, while a higher proportion of MSM was observed in the CMZ ($P < 0.0001$, all cases). For 2012–16, PDR was 13.4%, 8.9% and 11.2% in the CMZ, Tijuana and Cancun respectively. NNRTI PDR was highest in the three regions (8.7%, 4.8% and 8.1% respectively, $P < 0.05$); nevertheless, NNRTI PDR in Tijuana was lower than in the CMZ ($P = 0.01$). For 2008–16, we observed increasing efavirenz resistance trends in all regions ($P < 0.05$, all cases), reaching 11.8%, 6.1% and 8.3% respectively in 2016. Increasing efavirenz resistance was mostly associated with increasing K103N frequency ($P = 0.007$ CMZ, $P = 0.03$ Tijuana, not significant for Cancun).

Conclusions: Our study suggests different NNRTI PDR prevalence and transmission dynamics in three geographical areas of Mexico. Even when increasing trends in efavirenz resistance were observed in the three areas, our observations support that, in a large country such as Mexico, subnational surveillance and locally tailored interventions to address drug resistance may be a reasonable option.

Introduction

By the end of 2016, the WHO reported 37 million people globally living with HIV.^{1,2} Of them, 18.2 million were receiving ART as a result of the global response to HIV,^{1,3} following the publication of the 2016 WHO guidelines on the use of antiretroviral drugs that recommend treating all persons living with HIV regardless of CD4 T cell count.⁴ ART has significantly reduced transmission, morbidity and mortality associated with HIV infection around the world.^{4–6} However, the increase in ART exposure without a well-defined public health response to HIV drug resistance has inevitably increased

the risk of emergence, transmission and spread of drug-resistant viruses, which can lead to early first-line ART failure.^{7,8} Several studies have evidenced high pretreatment drug resistance (PDR) levels mainly associated with NNRTIs.^{9–15} Furthermore, meta-analyses have evidenced a temporal increase in PDR associated with NNRTI globally and in the Latin American and Caribbean region.^{16–19} Additionally, in 2015–16, nationally representative reports from some Latin American countries following WHO-recommended methodologies for HIV drug resistance surveillance have documented levels of NNRTI PDR >10% among people starting first-line ART.^{20–22} NNRTI-based regimens are widely used in

low-/middle-income countries, including Latin America, as they are the currently recommended first-line option by the WHO.⁴ Because baseline HIV drug resistance testing is not recommended and is not readily available in most low-/middle-income countries, persons with PDR may not be identified and may not receive an ART regimen that would be most effective for them, which could lead to further transmission and spread of drug-resistant HIV. In Mexico, the first nationally representative WHO PDR survey found an overall PDR prevalence of 13.5%, with 9.2% NNRTI PDR.^{21,23} The National HIV Program in Mexico is currently analysing options to implement a national public health strategy to respond to the high PDR levels observed. Owing to the size and complexity of the country, a possible alternative may be to assess if internal differences exist in PDR prevalence and trends within the country to prioritize specific regions. The aim of this study was to assess PDR prevalence and temporal trends in three geographic areas of Mexico: the Central Metropolitan Zone (CMZ), Tijuana and Cancun.

Patients and methods

Study population

A cross-sectional, retrospective, surveillance study was conducted in 2948 HIV-infected, ART-naïve Mexicans aged >18 years old, enrolled in three geographic areas: the CMZ ($n = 1285$ individuals from Mexico City and Mexico State); Tijuana, Baja California ($n = 743$); and Cancun, Quintana Roo ($n = 920$). Individuals from Tijuana were enrolled at Tijuana's General Hospital; individuals from Cancun at the Ministry of Health HIV clinic (CAPASITS) in Cancun; and individuals from the CMZ at the Condesa Specialized Clinic, the National Institute of Respiratory Diseases (INER), the National Institute of Medical Sciences and Nutrition, the General Hospital in Mexico City, CAPASITS Nezahualcoyotl, CAPASITS Tlalnepantla and CAPASITS Ecatepec in the State of Mexico. The flowchart for study population selection and analyses is shown in Figure S1 (available as Supplementary data at JAC Online).

The study used convenience sampling, inviting all persons with recent HIV diagnosis in the participating centres to donate blood samples during recruitment periods. The geographic areas included were selected to contrast three regions in Mexico with known different epidemiological characteristics, which stand out as critical points of the national epidemic and could show different dynamics of HIV drug resistance spread: Tijuana, a border city characterized by a complex epidemic intermixing several risk populations including MSM, persons who inject drugs, people who have transactional sex, Mexican and Central American migrants, together with high-risk situations including poverty and marginalization, discrimination and violence;^{24–27} Cancun, a well-known tourist centre with an epidemic influenced by sex tourism and increasing risk resulting in higher overall HIV prevalence compared with the national average;^{28,29} and the CMZ, including Mexico City and suburbs, comprising 25% of persons living with HIV in the country,²⁸ and reflecting the characteristic concentrated epidemic in Mexico heavily affecting MSM and transsexual persons. Participating clinics were also selected by convenience, depending on the possibility of establishing long-term collaborations for drug resistance surveillance.

All samples were sent to and processed at INER, Mexico City, within 48 h of collection. CD4+ T cell counts were assessed using the TruCount Kit in FACSCanto II instruments (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and plasma viral load was determined with the m2000 system (Abbott, Abbott Park, IL, USA).

Ethics

This study was reviewed and approved by the Ethics Committee of the INER and was conducted according to the principles of the Declaration of

Helsinki. Participants gave written informed consent before blood sample donation. Demographic data were collected through direct application of a questionnaire at the time of sample donation.

HIV sequencing and drug resistance assessment

HIV RNA was extracted from 1 mL of plasma (QIAamp Viral RNA Kit; QIAGEN, Valencia, CA, USA). HIV protease (PR) and RT were amplified using a previously described inhouse-developed protocol (HXB2 positions: PR 1–99, RT 1–335)³⁰ or the standardized CDC protocol (HXB2 positions: PR 6–99, RT 1–251).³¹ Sequences were obtained using the BigDye 3.1 chemistry on a 3730xl Genetic Analyser (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and assembled using ReCall (<http://pssm.cfenet.ubc.ca/>). HIV drug resistance was assessed using the Stanford HIVdb tool v8.3 (<https://hivdb.stanford.edu/>). Sequences with PDR were defined as those with a Stanford Score of 15 or higher to the following antiretroviral drugs: nevirapine, efavirenz, any NRTI, darunavir/ritonavir, lopinavir/ritonavir or atazanavir/ritonavir, according to the criterion suggested by the WHO.³² To identify susceptibility to individual antiretrovirals or ART regimens, the following thresholds were considered: low- (15–29), intermediate- (30–59) and high-level resistance (>60), according to Stanford HIVdb scores. Drug resistance mutation frequency was calculated by direct counting. In this case, we included all mutations considered by the Stanford HIVdb tool, even when some of them were not relevant for the estimation of overall PDR prevalence (e.g. E138AKR, associated with resistance to rilpivirine and etravirine, which are not used in Mexico).

Duration of infection

Recent infections were identified using a multitest algorithm as follows: individuals with <1 year of diagnosis, CD4+ T cell counts ≥ 200 cells/mm³, plasma viral load >400 RNA copies/mL, HIV-1-Lag-Avidity EIA (Sedia, Portland, OR, USA) ODn ≤ 1.5 (confirmed in duplicate). This algorithm has a seroconversion period window of 130 days (95% CI 118–142).³³

Phylogenetic analysis

Sequences were aligned by codons using ClustalW in Mega v6,³⁴ after removal of codons associated with drug resistance according to Stanford HIVdb v8.3.³⁵ Maximum likelihood trees were constructed using the GTR + Γ + I nucleotide substitution model in FastTree 2.1.9 (<http://microbe.sonline.org/fasttree>).³⁶ Reference sequences for different HIV subtypes were obtained at Los Alamos HIV Sequence Database (www.hiv.lanl.gov) and included in the alignments. Trees were visualized and coloured in Mega v6. Possible clusters of transmission were identified using Cluster Picker,^{37,38} with a 1.5% genetic distance threshold.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed in GraphPad Prism 7 (San Diego, CA, USA). Comparisons between groups were performed using Fisher's exact or χ^2 test for categorical variables and Kruskal–Wallis or Mann–Whitney tests for continuous numerical variables. Trends in time for HIV drug resistance prevalence and frequency of drug resistance mutations were assessed with Spearman correlation.

Results

Epidemiological and clinical characteristics of the study cohorts

Demographic and clinical data for participants enrolled during the 2012–16 period, in which enrolment was active for the three cohorts, were compared (Table 1). As has been previously described,

Table 1. Epidemiological and clinical characteristics of the study population^a

Demographic/clinical variable	CMZ	Tijuana	Cancun	P value ^b
Number of individuals	576	604	767	
Median age, years (IQR)	30 (24–37)	34 (26–42)	30 (24–37)	<0.0001
Gender, n (%)				
male	520 (90.3)	430 (71.2)	638 (83.2)	<0.0001
female	56 (9.7)	174 (28.8)	129 (16.8)	<0.0001
Median viral load, log copies/mL (IQR)	5.1 (4.5–5.6)	4.9 (4.3–5.5)	4.9 (4.4–5.4)	0.0004
Median CD4+ T counts, cells/mm ³ (IQR)	257 (102–413)	222 (65–444)	255 (106–447)	NS
Median % CD4+ T cells, (IQR)	14 (7–19)	14 (7–22)	13 (7–20)	NS
Longevity of infection, n (%) ^c				
recent	157 (27.3)	166 (27.5)	212 (27.6)	NS
long-standing	419 (72.7)	438 (72.5)	555 (72.4)	NS
Marital status, n (%)				
domestic partnership	36 (6.2)	158 (26.2)	134 (17.3)	<0.0001
married	61 (10.6)	48 (7.9)	62 (9.3)	NS
single	384 (66.7)	368 (60.9)	556 (72.5)	<0.0001
other/unknown	95 (16.5)	30 (5.0)	16 (2.1)	<0.0001
Education, n (%)				
illiterate	2 (0.3)	9 (1.5)	24 (3.1)	0.0006
elementary	25 (4.3)	156 (25.8)	113 (14.7)	<0.0001
high school	226 (39.2)	314 (52.0)	401 (52.3)	<0.0001
degree/technician	230 (39.9)	82 (13.6)	190 (24.8)	<0.0001
postgraduate	14 (2.4)	3 (0.5)	7 (0.9)	0.006
other/unknown	79 (13.7)	40 (6.6)	32 (4.2)	<0.0001
Employment, n (%)				
employed	307 (53.3)	171 (28.3)	377 (49.2)	<0.0001
unemployed	131 (22.7)	309 (51.2)	303 (39.5)	<0.0001
student	56 (9.7)	11 (1.8)	40 (5.2)	<0.0001
other/unknown	82 (14.2)	113 (18.7)	47 (6.1)	<0.0001
HIV transmission risk factor, n (%)				
heterosexual	113 (19.6)	330 (54.6)	289 (37.7)	<0.0001
MSM	305 (52.9)	131 (21.5)	346 (45.1)	<0.0001
bisexual	20 (3.5)	50 (8.3)	26 (3.4)	<0.0001
IVDU	3 (0.5)	37 (6.1)	10 (1.3)	<0.0001
other/unknown	135 (23.4)	52 (8.6)	96 (12.5)	<0.0001
Subtype, n (%)				
B	569 (98.8)	696 (98.9)	756 (98.6)	NS
non-B	7 (1.2)	8 (1.1)	11 (1.4)	NS

NS, non-significant.

^aParticipants enrolled in the 2012–16 period were considered for the analysis.

^b $P < 0.05$ was considered statistically significant using χ^2 or Kruskal–Wallis test.

^cLongevity of infection was defined using a multitest algorithm as described in the Patients and methods.

the three cohorts were characterized by late presentation to clinical care (median CD4 count 257, 255 and 222 cells/mm³ for the CMZ, Cancun and Tijuana respectively).^{39,40} The median age in Tijuana was higher than in the CMZ and Cancun (34 years versus 30, and 30 respectively, $P < 0.0001$), as well as the proportion of females (28.8% versus 9.7%, and 16.8%, $P < 0.0001$). Education levels (persons with degree: 13.6% versus 39.9%, and 24.8%; $P < 0.0001$) and employment rates (28.3% versus 53.3%, and 49.2%; $P < 0.0001$) were lower in Tijuana, compared with the CMZ and Cancun. The proportion of MSM was highest in the CMZ (52.9%), followed by Cancun (45.1%) and Tijuana (21.5%)

($P < 0.0001$). As expected, persons who inject drugs were more frequently found in Tijuana than in the CMZ or Cancun (6.1% versus 0.5%, and 1.3%; $P < 0.0001$). HIV subtype B was the most prevalent (>98% in all regions). Non-B viruses found included: BD, C, F1, G, CRF12_BF and CRF18_cpx.

PDR comparison between cohorts

PDR level for the 2012–16 period was estimated and compared between cohorts. The overall PDR prevalence considering all regions together was 11.1% (95% CI 9.8%–12.6%), NNRTI being [7.2%,

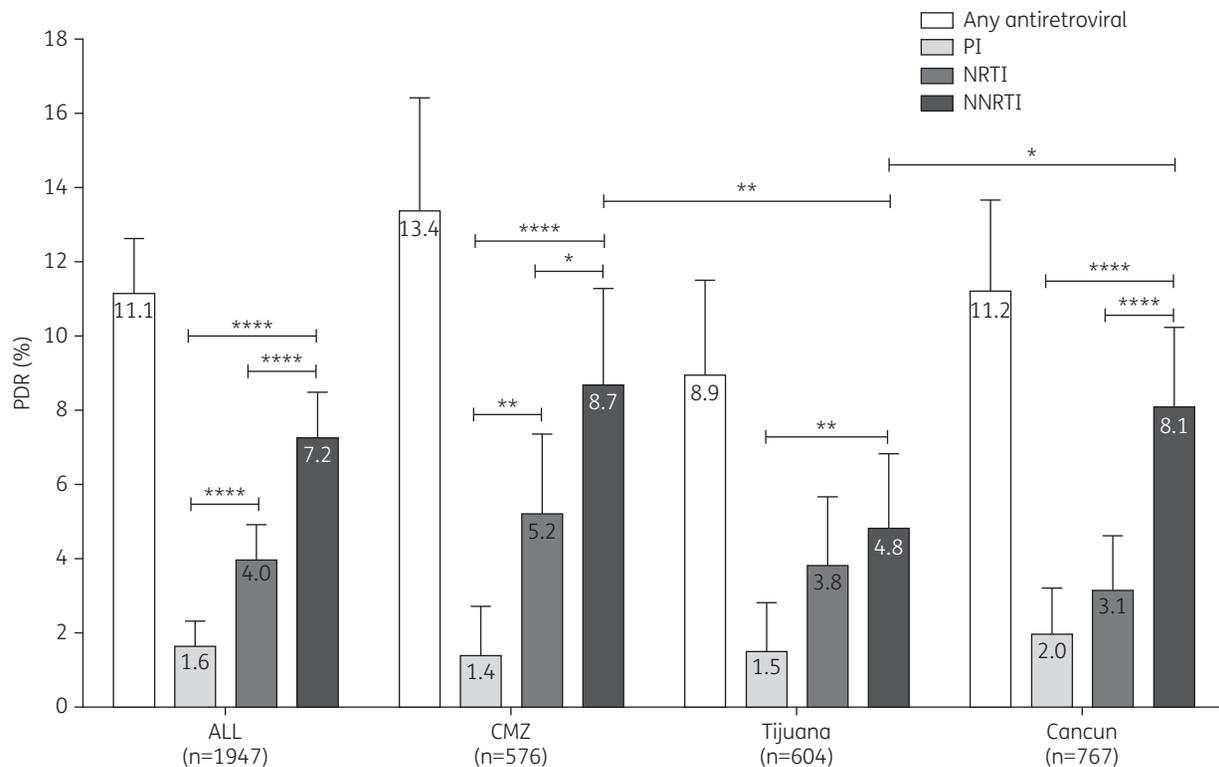


Figure 1. PDR prevalence in three geographic areas of the Mexican HIV epidemic, 2012–16. PDR was estimated from HIV protease and RT sequences using the Stanford HIVdb tool (v8.3). Individuals with PDR were defined as those having a score ≥ 15 for any of the following drugs: darunavir/ritonavir, lopinavir/ritonavir, atazanavir/ritonavir, any NRTI, nevirapine and efavirenz. Error bars represent 95% CI. Significant comparisons (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ and **** $P < 0.0001$ by Fisher's exact test) are shown.

(95% CI 6.1%–8.5%)] the most affected drug class, followed by NRTI [4.0% (95% CI 3.1%–4.9%)] and PI [1.6% (95% CI 1.1%–2.3%)] ($P < 0.0001$) (Figure 1). Analysing each cohort separately, we consistently observed moderate overall PDR levels: 13.4% (95% CI 10.7%–16.4%), 8.9% (95% CI 6.8%–11.5%) and 11.2% (95% CI 9.1%–13.7%) for the CMZ, Tijuana and Cancun respectively; with higher levels of NNRTI PDR (8.7%, 4.8% and 8.1% respectively; $P < 0.05$) compared with other drug classes. Nevertheless, NNRTI PDR in Tijuana was lower than in the CMZ ($P = 0.01$). No differences were observed in epidemiological and clinical characteristics between individuals with PDR and without PDR in the CMZ, Tijuana or Cancun (Table S1). Taken together, these results confirm the dominance of NNRTI PDR in each of the evaluated zones, but suggest slightly lower PDR prevalence in Tijuana.

Drug resistance mutation patterns

Drug resistance mutation frequency distributions in the three cohorts showed some important point differences (Table 2). The most prevalent PI resistance mutations were: Q58E (1.4%) and M46IL (0.7%) in the CMZ; M46IL (2.0%) and L90M (1.3%) in Cancun; and M46IL (2.0%) and Q58E (1.0%) in Tijuana. L90M ($P = 0.0020$) and I54V ($P = 0.0374$) were more prevalent in Cancun. Of note, these mutations alone probably confer little-to-no PI resistance. The most frequent NRTI resistance mutations were: M41L (2.1% and 0.8%) and T215 revertants (2.1% and 2.0%)

in the CMZ and Cancun respectively, and D67AEN (2.3%) and T215 revertants (2.3%) in Tijuana. D67AEN was more frequent in Tijuana ($P = 0.0007$) and M184V was more frequent in the CMZ ($P = 0.0015$). The most prevalent NNRTI resistance mutations were V179DET (5.6%) and K103NS (4.7%) in the CMZ; K103N (4.4%) and V179DET (3.4%) in Cancun; and V179DET (7.1%) and E138AKR (2.6%) in Tijuana. Of note, K103N had lower (1.7%, $P = 0.0069$) and V179DET higher (7.1%, $P = 0.0075$) frequency in Tijuana; Y188CFL was more frequent in the CMZ (1.2%; $P = 0.0189$), and G190AES was less frequent in Tijuana (0%; $P = 0.0158$). It is worth mentioning that, even when E138AKR was not considered for PDR estimations in our analyses, the moderate frequency of this mutation needs to be taken into account if rilpivirine is ever to be used as part of rescue or prevention regimens in Mexico. In all, these results suggest different drug resistance mutation frequency distributions in the three studied regions, with notably lower prevalence of K103N in Tijuana.

Susceptibility to individual drugs and the most widely used ART regimens

Overall, the most affected drugs were nevirapine (6.1%) and efavirenz (5.7%) (Figure 2). Consequently, PDR to the most widely used ART regimen in Mexico, tenofovir + emtricitabine + efavirenz, was 7.9%.

Considering each cohort separately, PDR level (at least low-level resistance) was highest to nevirapine (8.7%, 7.2% and 4.5%

Table 2. Drug resistance mutation frequency in three geographic areas of Mexico^a

Mutation	PI				NRTI				NNRTI					
	CMZ (n = 576)	Tijuana (n = 604)	Cancun (n = 767)	P value ^b	Mutation	CMZ (n = 576)	Tijuana (n = 604)	Cancun (n = 767)	P value ^b	Mutation	CMZ (n = 576)	Tijuana (n = 604)	Cancun (n = 767)	P value ^b
L10F	3 (0.5)	1 (0.2)	0 (0.0)	NS	M41L	12 (2.1)	9 (1.5)	6 (0.8)	NS	A98G	1 (0.2)	2 (0.3)	4 (0.5)	NS
K20MT	1 (0.2)	2 (0.3)	0 (0.0)	NS	E44D	1 (0.2)	2 (0.3)	2 (0.3)	NS	L100I	0 (0.0)	2 (0.3)	0 (0.0)	NS
L23I	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.1)	NS	A62V	0 (0.0)	1 (0.2)	2 (0.3)	NS	K101EP	4 (0.7)	3 (0.5)	3 (0.4)	NS
L24F	1 (0.2)	0 (0.0)	1 (0.1)	NS	K65NR	1 (0.2)	1 (0.2)	0 (0.0)	NS	K103NS	26 (4.7)	10 (1.7)	34 (4.4)	0.007
D30N	0 (0.0)	2 (0.3)	1 (0.1)	NS	D67AEN	3 (0.5)	14 (2.3)	3 (0.4)	0.0007	V106AM	1 (0.2)	2 (0.3)	1 (0.1)	NS
L33F	3 (0.5)	2 (0.3)	6 (0.8)	NS	T69DN	3 (0.5)	2 (0.3)	3 (0.5)	NS	V108I	3 (0.5)	3 (0.5)	10 (1.3)	NS
V32I	1 (0.2)	1 (0.2)	0 (0.0)	NS	K70EWQT	1 (0.2)	0 (0.0)	2 (0.3)	NS	E138AKR	13 (2.3)	16 (2.6)	13 (1.7)	NS
K43T	1 (0.2)	0 (0.0)	2 (0.3)	NS	L74FIV	2 (0.3)	2 (0.3)	0 (0.0)	NS	V179DET	32 (5.6)	43 (7.1)	26 (3.4)	0.008
M46IL	4 (0.7)	12 (2.0)	15 (2.0)	NS	V75ILM	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.3)	NS	Y181C	3 (0.5)	5 (0.8)	7 (0.9)	NS
I47AV	1 (0.2)	1 (0.2)	1 (0.1)	NS	F77L	2 (0.3)	0 (0.0)	1 (0.1)	NS	Y188CFL	7 (1.2)	1 (0.2)	2 (0.3)	0.02
G48R	1 (0.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	NS	Y115F	1 (0.2)	1 (0.2)	0 (0.0)	NS	G190AES	6 (1.0)	0 (0.0)	11 (1.4)	0.02
I50V	1 (0.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	NS	M184IV	7 (1.2)	0 (0.0)	1 (0.1)	0.002	H221Y	1 (0.2)	2 (0.3)	5 (0.7)	NS
F53L	0 (0.0)	1 (0.2)	1 (0.1)	NS	L210W	2 (0.3)	1 (0.2)	2 (0.3)	NS	P225H	1 (0.2)	0 (0.0)	4 (0.5)	NS
I54V	3 (0.5)	0 (0.0)	8 (1.0)	0.04	T215YF	1 (0.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	NS	F227L	1 (0.2)	2 (0.3)	1 (0.1)	NS
Q58E	8 (1.4)	6 (1.0)	6 (0.8)	NS	T215CDENLS	12 (2.1)	14 (2.3)	15 (2.0)	NS	M230L	2 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	NS
G73ST	0 (0.0)	1 (0.2)	2 (0.3)	NS	K219QENR	5 (0.9)	11 (1.8)	4 (0.5)	NS	P236L	0 (0.0)	1 (0.2)	0 (0.0)	NS
T74P	0 (0.0)	2 (0.3)	0 (0.0)	NS						K238N	0 (0.0)	2 (0.3)	1 (0.1)	NS
V82AFT	2 (0.3)	4 (0.7)	8 (1.0)	NS						Y318F	1 (0.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	NS
N88DG	2 (0.3)	2 (0.3)	2 (0.3)	NS										
L90M	0 (0.0)	1 (0.2)	10 (1.3)	0.002										

Values shown are n (%).

^aAll drug resistance mutations reported by the Stanford HIVdb tool (v.8.3) were considered. Mutations with frequency >0 in at least one region are shown. Participants enrolled in the 2012–16 period were considered for the analysis.

^bP < 0.05 was considered statistically significant using χ^2 test; NS, not significant.

for the CMZ, Cancun and Tijuana respectively) and efavirenz (8.3%, 6.6% and 4.0%). However, the PDR level to these two drugs in Tijuana was lower than in Cancun and the CMZ ($P < 0.05$ in all cases) (Figure 2). Of note, PDR to rilpivirine (mainly low-level resistance) was among the highest in the three cohorts (5.6%, 5.6% and 4.3%), largely associated with E138AKR (2.3%, 1.7% and 2.6). High-level PDR to PI was rare in Tijuana and high-level PDR to NRTI was low in Tijuana and Cancun compared with the CMZ. PDR to first-line regimens was highly influenced by efavirenz resistance reaching 10.1%, 9.9% and 11.8% for tenofovir + emtricitabine + efavirenz, abacavir + lamivudine + efavirenz and zidovudine + lamivudine + efavirenz respectively in the CMZ. PDR levels for the same regimens were 8.0%, 8.0% and 8.3% respectively in Cancun; and 5.6%, 5.6% and 7.1% in Tijuana. As expected, PI-containing ART regimens were less affected than NNRTI-containing regimens, with the most widely PI-containing regimen, tenofovir + emtricitabine + atazanavir/ritonavir reaching 3.5%, 3.0% and 3.0% in the CMZ, Cancun and Tijuana respectively. Overall, our results suggest that efavirenz/nevirapine and NNRTI-based ART regimens are more highly affected by HIV drug resistance in all the studied regions.

PDR temporal trends

Considering all cohorts together, we observed a significant increase in NNRTI PDR from 2008 to 2009 (1.9%–9.9%, $P < 0.0001$, $r = 0.98$)

(Figures 3 and S2). Dividing by cohort, we observed increasing overall PDR (7.7%–15.7%, $P = 0.002$, $r = 0.90$), associated with increasing NNRTI PDR (1.9%–11.8%, $P = 0.0008$, $r = 0.92$) in the CMZ. Tijuana also showed increasing NNRTI PDR (1.6%–8.5%, $P = 0.03$, $r = 0.89$), but the trend was not significant in Cancun.

Of note, an increasing trend in efavirenz resistance was observed in all three independent cohorts (1.0%–11.8%, $P = 0.0008$, $r = 0.93$ in the CMZ; 1.7%–6.1%, $P = 0.03$, $r = 0.88$ in Tijuana; and 2.5%–8.3%, $P = 0.03$, $r = 0.88$ in Cancun) (Figure 3), that resulted in an overall significant increase in PDR tenofovir + emtricitabine + efavirenz in the CMZ (2.6%–13.7%, $P = 0.0007$, $r = 0.93$) and Cancun (5.1%–8.3%, $P = 0.03$, $r = 0.88$) (Figure S3). No significant trends in resistance to tenofovir and emtricitabine were observed.

We next looked for temporal trends in drug resistance mutation frequency associated with the observed PDR trends (Figure S4). We observed a significant increasing trend only for K103N/S in all cohorts together (0.5%–4.7%, $P = 0.006$, $r = 0.85$), and for the CMZ (0.6%–9.8%, $P = 0.04$, $r = 0.72$) and Tijuana (0.0%–3.7%, $P = 0.03$, $r = 0.90$) (Figures 3 and S4). Furthermore, even when an increasing trend was not significant, thymidine analogue mutations in Tijuana reached higher levels than in the CMZ or Cancun in 2016 (7.3% versus 0%, and 0.4% respectively, $P < 0.0001$).

Taken together, these results confirm increasing trends in efavirenz resistance in all regions, mainly explained by increasing K103N frequency.

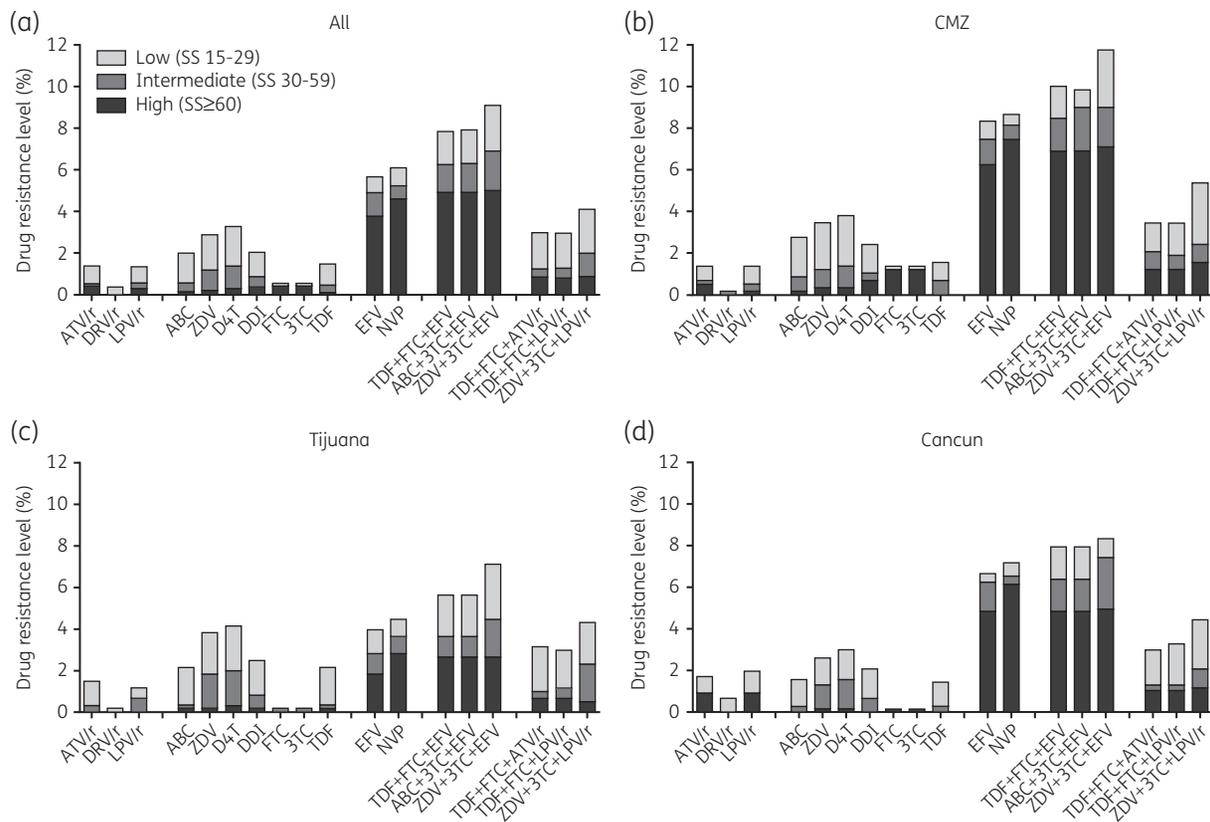


Figure 2. Drug resistance levels by antiretroviral drug, 2012–16. PDR levels by drug were estimated from HIV protease and RT sequences using the Stanford HIVdb tool (v8.3). Drug resistance levels were classified according to the Stanford score (SS) as: high, ≥ 60 ; intermediate, 30–59; or low, ≥ 15 –29. PDR to the most frequently used first-line ART combinations is shown. PIs: ATV/r, atazanavir/r; DRV/r, darunavir/r; LPV/r, lopinavir/r. NRTIs: 3TC, lamivudine; ABC, abacavir; ZDV, zidovudine; D4T, stavudine; /r, /ritonavir; DDI, didanosine; FTC, emtricitabine; TDF, tenofovir. NNRTIs: EFV, efavirenz; NVP, nevirapine.

Duration of infection and PDR

We assessed HIV drug resistance in recently infected individuals in each region. The rate of recently infected individuals was 27.3%, 27.5% and 27.6% in the CMZ, Tijuana and Cancun respectively (Tables 1 and S2).

No significant differences were observed in PDR prevalence between individuals with recent and long-standing infection for any drug class in any of the three cohorts. In the CMZ and Cancun, NNRTI PDR was higher than NRTI and PI PDR both in individuals with recent and long-standing infection ($P < 0.005$ in all cases), while in Tijuana NNRTI PDR was higher only in individuals with long-standing infection ($P = 0.02$) (Table S2). Interestingly, we observed an increasing trend in NNRTI PDR in recently infected individuals in the CMZ from 2012 to 2016 (0%–23.1%, $P = 0.02$, $r = 1$), which was not observed in individuals with long-standing infection (Figure S5). Of note, only K103N showed significantly higher frequency in individuals with recent versus long-standing infection in the CMZ (7.6% versus 3.6%, $P = 0.04$) (Figure S6).

Transmission networks of viruses with PDR

To get further insight on PDR transmission, we examined transmission clusters within each cohort. We found a total of 121 clusters including two to six individuals; 15.7% (19 of 121) of the clusters

included more than two sequences and 78.5% (95 of 121) of clusters included only males and 61.2% (74 of 121) included at least one self-identified MSM.

Overall, 28.1% (34 of 121) of clusters included at least one virus with drug resistance mutations: 13.2% (16 of 121) with NNRTI, 5.8% (7 of 121) with NRTI, 6.6% (8 of 121) with PI and 2.5% (3 of 121) with multiple class mutations (Table 3); 82.4% (28 of 34) of clusters with drug-resistant viruses included only males and the clusters including females were only observed in Cancun and Tijuana, but not in the CMZ. The most frequent drug resistance mutations found in clusters were K103N (6.6%, 8 of 121), E138A (5.7%, 7 of 121) and protease M46L/I (4.9%, 6 of 121). Interestingly, no clusters with K103N were observed in Tijuana. The CMZ, Tijuana and Cancun comprised 37.2% (45 of 121), 11.6% (14 of 121) and 51.2% (62 of 121) of clusters respectively, with 22.2% (10 of 45), 35.7% (5 of 14) and 30.6% (19 of 62) of clusters respectively including sequences with drug resistance mutations. Overall, these results suggest onward transmission of viruses with PDR in the three regions.

Discussion

We present a study on HIV PDR in three geographic areas of Mexico: the CMZ, Tijuana and Cancun, contrasting subnational

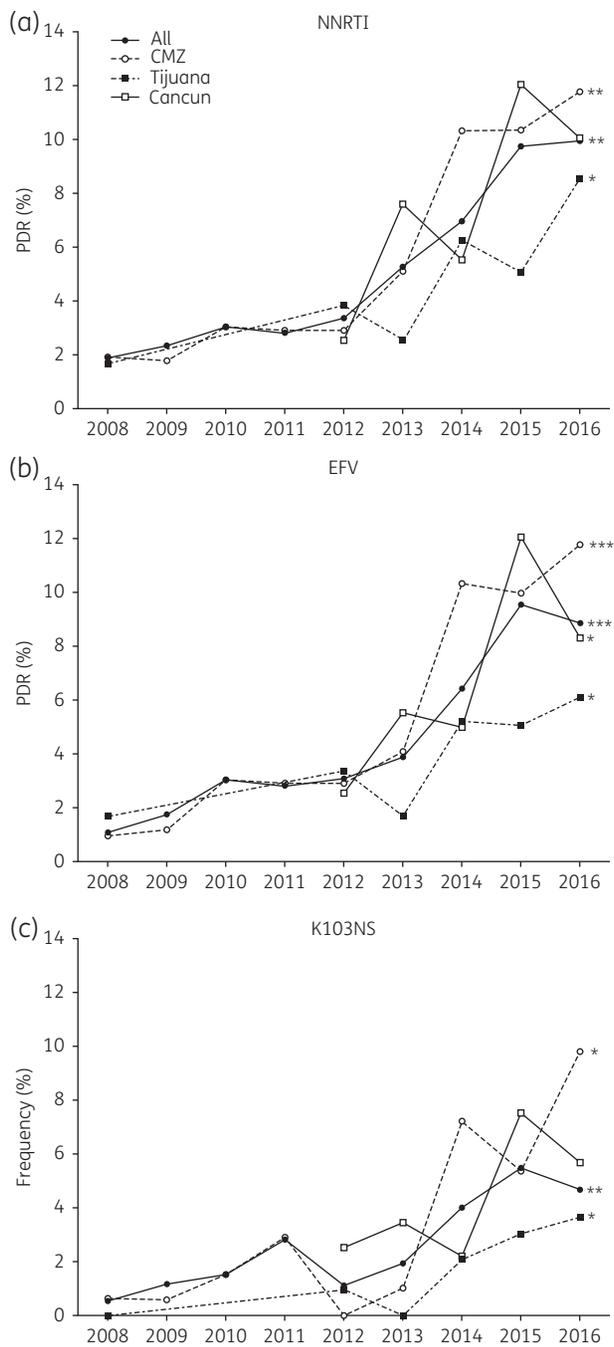


Figure 3. Temporal PDR trends in three geographic areas in the Mexican HIV epidemic. (a) NNRTI PDR, (b) EFV resistance and (c) K103NS frequency were estimated by year of enrolment from HIV protease and RT sequences using the Stanford HIVdb tool (v8.3). Individuals with PDR were defined as those having a Stanford score ≥ 15 to any NNRTI or to EFV. Significant trends (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, Spearman correlation) are shown. EFV, efavirenz.

differences in drug resistance prevalence and transmission characteristics. Our study follows up on a nationally representative PDR survey in which a PDR level of 13.5%, associated mainly with NNRTIs (9.2%) was observed (applying the same drug resistance

definition criterion as here).^{21,23} Our study supports the findings of the national survey, with an overall PDR level reaching 12.8% in 2016, mainly associated with NNRTI (9.9%), considering the three surveyed regions together. Our observations are also consistent with nationally representative PDR surveys carried out in other Latin American countries between 2015 and 2016 showing NNRTI PDR levels approaching 10%, including Argentina (9.4%)²⁰ and Guatemala (13.3%).²² Nevertheless, our study reveals differences in PDR prevalence and transmission characteristics within Mexico, with lower NNRTI PDR prevalence in Tijuana, different drug resistance mutation prevalence and different transmission dynamics as suggested by demographic characteristics of individuals within transmission clusters in each area. Additionally, we show clear evidence of a significant temporal increase in efavirenz resistance in all areas. These observations support previous findings in the Latin America and Caribbean region,^{16–19,41} as well as in specific countries in the region, showing increasing NNRTI PDR, associated with the widespread use of efavirenz- or nevirapine-containing first-line ART regimens.^{9–12,23} Indeed, Mexican ART guidelines currently recommend the use of NNRTI-based first-line regimens,²⁹ in agreement with WHO ART guidelines,⁴ with >80% of persons currently starting on efavirenz-containing regimens.^{29,42,43}

The Mexican HIV Program has been highly successful in procuring ART for all persons diagnosed with HIV and linked to care, with >127000 persons on ART by the end of 2016.⁴³ However, important inequalities in early warning indicators associated with HIV drug resistance exist within the country, including retention in care, viral load suppression rate and viral load coverage.⁴³ Considering this scenario, and considering the costs of implementing a nationwide public health response to HIV drug resistance (including switching to dolutegravir-based first-line regimens or performing HIV drug resistance tests in all persons starting ART), the Mexican HIV Program has proposed possible localized strategies to respond to HIV drug resistance where the urgency would be highest. To do this, subregional HIV drug resistance surveys are warranted. Our study explores for the first time the possible existence of subnational differences in HIV PDR prevalence and trends and supports the need to perform subnational HIV drug resistance surveillance in a big and diverse country such as Mexico. We contrast observations in three geographical zones, chosen because of their known distinct characteristics and importance within the HIV epidemic in Mexico: Tijuana, a city in the north border considered a 'melting pot' for groups at higher risk of HIV acquisition;^{24–27} Cancun, a well-known tourist centre with an epidemic influenced by high-risk conduct;^{28,42} and the CMZ, reflecting the characteristic concentrated epidemic in Mexico disproportionately affecting MSM and transgender persons.²⁸ Of note, Baja California and Quintana Roo, where Tijuana and Cancun are respectively located, were among the top five states with the lowest rates of viral suppression in 2016 (74% and 77% respectively), and they were both under the national average of retention on ART at 12 months (both 84%) and viral load coverage (70% and 68%).⁴³ Although our study has the limitation of using convenience sampling, most probably resulting in sampling biases, the long follow-up, relatively large cohorts and inclusion of reference centres for the epidemics in each zone make our observations relevant and support the need for further subnationally representative surveys.

Table 3. Demographic characteristics of large clusters^a

Cluster	Size	Bootstrap	PDR ^b	PDR class	DRM ^c	Male	MSM	Het	Unknown
CMZ-01	4	1	4/4	NRTI	T215S	4/4	–	–	4/4
CMZ-05	2	0.956	1/2	PI	K20MT	2/2	–	1/2	1/2
CMZ-06	2	0.931	2/2	NNRTI	E138A	2/2	–	–	2/2
CMZ-11	3	0.975	2/3	NNRTI	K103N	3/3	–	–	3/3
CMZ-32	2	0.939	1/2	NRTI	M41ML	2/2	2/2	–	–
CMZ-33	2	0.985	1/2	NRTI	M184MV	2/2	1/2	–	1/2
CMZ-39	2	1	1/2	NNRTI	K103N	2/2	2/2	–	–
CMZ-42	2	0.995	2/2	PI	M46I, N88G, L90M, Q58E	2/2	2/2	–	–
CMZ-44	2	0.997	1/2	NNRTI	K103N	2/2	1/2	–	1/2
CMZ-45	2	0.954	1/2	NNRTI	E138A	2/2	1/2	–	1/2
Tij-03	2	1	2/2	PI	M46L	2/2	1/2	1/2	–
Tij-04	2	1	2/2	NNRTI	V106A, E138A, F227L	2/2	2/2	–	–
Tij-05	2	0.996	2/2	NNRTI	E138A	2/2	1/2	1/2	–
Tij-15	2	0.937	2/2	NRTI	D67N, K219Q	1/2	–	2/2	–
Tij-17	3	1	1/3	NNRTI	V108I	3/3	–	3/3	–
Can-02	2	1	2/2	NNRTI	K103N	2/2	2/2	–	–
Can-04	2	0.936	2/2	PI	M46L	2/2	2/2	–	–
Can-09	2	1	1/2	NNRTI	K103N, K238N	2/2	2/2	–	–
Can-10	2	0.948	2/2	PI	M46L	2/2	1/2	1/2	–
Can-14	2	0.998	2/2	NRTI	M41L, T215D	2/2	–	1/2	1/2
Can-15	2	0.95	1/2	NNRTI	K103N	2/2	1/2	1/2	–
Can-18	3	0.981	3/3	PI	M46MIL	2/3	2/3	1/3	–
Can-21	2	1	1/2	NRTI	T69TADN	2/2	2/2	–	–
Can-30	3	0.929	1/3	NNRTI	K103NS, E138EA, P225H	3/3	3/3	–	–
Can-34	2	0.989	1/2	NNRTI	V106VA	1/2	–	2/2	–
Can-39	4	0.989	1/4	PI	I54S, F53L	4/4	2/4	2/4	–
Can-42	2	1	2/2	NNRTI	K103N	2/2	2/2	–	–
Can-47	3	0.993	1/3	PI	M46MI	2/3	1/3	1/3	1/3
Can-51	2	0.954	2/2	PI+NNRTI	I54V, V82F, L90M, L33F, G190A	2/2	1/2	1/2	–
Can-52	3	0.948	3/3	PI+NNRTI	I54V, V82F, L90M, L33F, G190A	3/3	2/3	1/3	–
Can-05	3	1	3/3	PI+NNRTI	Q58E, A98G	3/3	3/3	–	–
Can-58	2	0.997	2/2	NNRTI	E138A	1/2	–	2/2	–
Can-62	2	1	1/2	NRTI	K70Q	1/2	–	2/2	–
Can-66	2	0.941	1/2	NNRTI	E138A	2/2	2/2	–	–

DRM, drug resistance mutations; Het, heterosexual.

^aClusters, defined by within-cluster patristic distances $\leq 1.5\%$, were identified using Cluster Picker. Clusters including sequences with PDR are shown.

^bPDR was estimated using the Stanford HIVdb tool. Individuals with PDR were defined as those having a score ≥ 15 to any antiretroviral drug.

^cAll drug resistance mutations reported by the Stanford HIVdb tool (v.8.3) are shown.

As expected, we observed increasing trends in efavirenz resistance in the three studied regions. However, PDR transmission in each region showed specific characteristics that could be associated with unique epidemiological and demographic characteristics of the affected populations. These general differences between zones suggest important differences in target populations that could warrant specific public health response strategies to HIV drug resistance in different zones. For example, we observed an increasing trend in NNRTI PDR transmission among recently infected persons in the CMZ, mainly composed by MSM, while no difference between individuals with recent and long-standing infection was observed in Tijuana and Cancun. Similar evidence of NNRTI resistance transmission in recently infected individuals in a large Latin

American city has been recently described in Rio de Janeiro.⁴⁴ Also noteworthy is the observation that clusters of viruses with PDR, including women, were only found in Cancun and Tijuana, not in the CMZ, suggesting differences in target groups for prevention efforts.

In conclusion, our study suggests different scenarios on HIV drug resistance in three geographic areas of Mexico comprising populations with different demographic characteristics, PDR transmission dynamics, performance in early warning indicators and NNRTI PDR prevalence. Even when increasing trends in efavirenz resistance were observed in the three areas, our study supports that, in a large country such as Mexico, subnational surveillance and locally tailored interventions to address drug resistance may be a reasonable option.

Acknowledgements

Members of the HIVDR MexNet Group

Ramón Hernández-Juan, Edna H. Rodríguez-Aguirre; Francisco J. Prado-Galbarro (National Institute of Respiratory Diseases, Mexico City); César Rivera-Benitez (General Hospital, Mexico City), Juan Sierra-Madero, Audelia Alanis-Vega (National Institute of Medical Sciences and Nutrition, Mexico City), Héctor Carrillo-Martínez (CAPASITS Nezahualcóyotl, Estado de México), José L. Centeno (CAPASITS Ecatepec, Estado de México), Everardo Barreto, Tanya Campos (CAPASITS Tlalnepantla, Estado de México), María J. del Carmen-Ricalde, Jorge Antonio Cauich Tamayo, David Valenzo-Loeza (CAPASITS Cancún, Quintana Roo), and Liliana Alejos Armenta (General Hospital Tijuana, Baja California).

Funding

This work was supported by grants from the Mexican Government (Comisión de Equidad y Género de las Legislaturas LX-LXI y Comisión de Igualdad de Género de la Legislatura LXII de la H. Cámara de Diputados de la República Mexicana), received by G. R. T. and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología received by S. A. R. (CONACyT SALUD-2013-01-202475; <http://www.conacyt.mx>). C. G. M. is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received fellowship no. 2618 from CONACYT.

Transparency declarations

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors report that no conflicts of interest exist.

Supplementary data

Figures S1 to S6 and Tables S1 and S2 are available as Supplementary data at JAC Online.

References

- UNAIDS. HIV Data and Statistics. http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_en.pdf.
- UNAIDS. Global AIDS update. http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/global-AIDS-update-2016_en.pdf.
- UNAIDS. Global HIV Statistics. <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>.
- WHO. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK374294/pdf/Bookshelf_NBK374294.pdf.
- Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC *et al.* Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998; **338**: 853–60.
- Eaton JW, Johnson LF, Salomon JA *et al.* HIV treatment as prevention: systematic comparison of mathematical models of the potential impact of antiretroviral therapy on HIV incidence in South Africa. *PLoS Med* 2012; **9**: e1001245.
- Wittkop L, Günthard HF, de Wolf F *et al.* Effect of transmitted drug resistance on virological and immunological response to initial combination antiretroviral therapy for HIV (EuroCoord-CHAIN joint project): a European multicohort study. *Lancet Infect Dis* 2011; **11**: 363–71.
- Hamers RL, Schuurman R, Sigaloff KC *et al.* Effect of pretreatment HIV-1 drug resistance on immunological, virological, and drug-resistance outcomes of first-line antiretroviral treatment in sub-Saharan Africa: a multicentre cohort study. *Lancet Infect Dis* 2012; **12**: 307–17.
- Avila-Rios S, García-Morales C, Garrido-Rodríguez D *et al.* HIV-1 drug resistance surveillance in antiretroviral treatment-naïve individuals from a reference hospital in Guatemala, 2010–2013. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2015; **31**: 401–11.
- Avila-Rios S, García-Morales C, Tapia-Trejo D *et al.* HIV drug resistance surveillance in Honduras after a decade of widespread antiretroviral therapy. *PLoS One* 2015; **10**: e0142604.
- Avila-Rios S, García-Morales C, Matías-Florentino M *et al.* HIV drug resistance in antiretroviral treatment-naïve individuals in the largest public hospital in Nicaragua, 2011–2015. *PLoS One* 2016; **11**: e0164156.
- Mendoza Y, Castillo Mewa J, Martínez AA *et al.* HIV-1 antiretroviral drug resistance mutations in treatment naïve and experienced Panamanian subjects: impact on national use of EFV-based schemes. *PLoS One* 2016; **11**: e0154317.
- Gagliardo C, Brozovich A, Birnbaum J *et al.* A multicenter study of initiation of antiretroviral therapy and transmitted drug resistance in antiretroviral-naïve adolescents and young adults with HIV in New York City. *Clin Infect Dis* 2014; **58**: 865–72.
- Lavu E, Kave E, Mosoro E *et al.* High levels of transmitted HIV drug resistance in a study in Papua New Guinea. *PLoS One* 2017; **12**: e0170265.
- Panichsillapakit T, Smith DM, Wertheim JO *et al.* Prevalence of transmitted HIV drug resistance among recently infected persons in San Diego, CA 1996–2013. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2016; **71**: 228–36.
- Avila-Rios S, Sued O, Rhee SY *et al.* Surveillance of HIV transmitted drug resistance in Latin America and the Caribbean: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2016; **11**: e0158560.
- Rhee SY, Blanco JL, Jordan MR *et al.* Geographic and temporal trends in the molecular epidemiology and genetic mechanisms of transmitted HIV-1 drug resistance: an individual-patient- and sequence-level meta-analysis. *PLoS Med* 2015; **12**: e1001810.
- Gupta RK, Jordan MR, Sultan BJ *et al.* Global trends in antiretroviral resistance in treatment-naïve individuals with HIV after rollout of antiretroviral treatment in resource-limited settings: a global collaborative study and meta-regression analysis. *Lancet* 2012; **380**: 1250–8.
- Frentz D, Van de Vijver DA, Abecasis AB *et al.* Increase in transmitted resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors among newly diagnosed HIV-1 infections in Europe. *BMC Infect Dis* 2014; **14**: 407.
- Bissio E, Barbás MG, Bouzas MB *et al.* Pretreatment HIV-1 drug resistance in Argentina: results from a surveillance study performed according to WHO-proposed new methodology in 2014–15. *J Antimicrob Chemother* 2017; **72**: 504–10.
- Ávila-Rios S, García-Morales C, Matías-Florentino M *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**: e579–e91.
- Girón-Callejas SA, Mendizábal-Burastero R, García Morales C *et al.* Guatemalan HIVdr Group. HIV pretreatment and acquired drug resistance: results from the first nationally representative survey conducted in Guatemala, 2016. In: *9th IAS Conference on HIV Science. Paris, France.* Abstract TUPEC0855.

- 23** Avila-Ríos S. Results from the Mexico HIVDR survey leading to country and regional responses. In: *9th IAS Conference on HIV Science. Paris, France*. Abstract MOSY0702.
- 24** Goldenberg S, Silverman J, Engstrom D et al. "Right here is the gateway": mobility, sex work entry and HIV risk along the Mexico-U.S. border. *Int Migr* 2014; **52**: 26–40.
- 25** Mehta SR, Wertheim JO, Brouwer KC et al. HIV transmission networks in the San Diego-Tijuana Border Region. *EBioMedicine* 2015; **2**: 1456–63.
- 26** Zhang X, Martinez-Donate AP, Nobles J et al. Substance use across different phases of the migration process: a survey of Mexican migrants flows. *J Immigr Minor Health* 2015; **17**: 1746–57.
- 27** Zhang X, Martinez-Donate AP, Simon NE et al. Risk behaviours for HIV infection among travelling Mexican migrants: the Mexico-US border as a contextual risk factor. *Glob Public Health* 2017; **12**: 65–83.
- 28** Censida. Vigilancia Epidemiológica de casos de VIH/SIDA en México. http://censida.salud.gob.mx/descargas/epidemiologia/RN_DIA_MUNDIAL_2016a.pdf.
- 29** Censida. Guía de Manejo Antirretroviral de las Personas con VIH. http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/179552/G_ARV2016_1.pdf.
- 30** Zhou Z, Wagar N, DeVos JR et al. Optimization of a low cost and broadly sensitive genotyping assay for HIV-1 drug resistance surveillance and monitoring in resource-limited settings. *PLoS One* 2011; **6**: e28184.
- 31** Avila-Ríos S, Mejía-Villatoro CR, García-Morales C et al. Prevalence and patterns of HIV transmitted drug resistance in Guatemala. *Rev Panam Salud Publica* 2011; **30**: 641–8.
- 32** WHO. Surveillance of HIV drug resistance in adults initiating antiretroviral therapy (pretreatment HIV drug resistance). http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112802/1/9789241507196_eng.pdf?ua=1.
- 33** Konikoff J, Brookmeyer R, Longosz AF et al. Performance of a limiting-antigen avidity enzyme immunoassay for cross-sectional estimation of HIV incidence in the United States. *PLoS One* 2013; **8**: e82772.
- 34** Tamura K, Stecher G, Peterson D et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; **30**: 2725–9.
- 35** University S. HIVdb Program. Genotypic Resistance Interpretation Algorithm. <https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-mutations/>.
- 36** Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* 2010; **5**: e9490.
- 37** Ragonnet-Cronin M, Hodcroft E, Hué S et al. Automated analysis of phylogenetic clusters. *BMC Bioinformatics* 2013; **14**: 317.
- 38** Wertheim JO, Kosakovsky Pond SL, Forgione LA et al. Social and genetic networks of HIV-1 transmission in New York City. *PLoS Pathog* 2017; **13**: e1006000.
- 39** Hernández-Romieu AC, del Rio C, Hernández-Ávila JE et al. CD4 counts at entry to HIV care in Mexico for patients under the "Universal Antiretroviral Treatment Program for the Uninsured Population," 2007–2014. *PLoS One* 2016; **11**: e0152444.
- 40** Crabtree-Ramírez B, Caro-Vega Y, Shepherd BE et al. Cross-sectional analysis of late HAART initiation in Latin America and the Caribbean: late testers and late presenters. *PLoS One* 2011; **6**: e20272.
- 41** Pineda-Peña AC, Bello DC, Sussmann O et al. HIV-1 transmitted drug resistance in Latin America and the Caribbean: what do we know? *AIDS Rev* 2012; **14**: 256–67.
- 42** Censida. Boletín de Atención Integral de Personas con VIH 2016, octubre-diciembre 2016. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/195333/Boletin_Nal_CENSIDA_AT_IN_oct_dic_2016.pdf.
- 43** Magis-Rodríguez CL. Panorama en México de los Antirretrovirales. In: *14 Congreso Internacional GEVIHSS IAPAC 2017. Guadalajara, Jalisco, Mexico*, Grupo de Estudios de VIH Sida del Sureste A.C.
- 44** Ferreira ACG, Coelho LE, Grinsztejn E et al. Transmitted drug resistance in patients with acute/recent HIV infection in Brazil. *Braz J Infect Dis* 2017; pii: S1413-8670(16)30330-0.