



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**



“Diversidad genética y resistencia molecular del VIH-1 que infecta a militares peruanos de Lima y Callao, 2015 - 2018”

TESIS

Para optar el título profesional de Licenciado en:

Biología - Microbiología - Parasitología

PRESENTADO POR:

Br. Jonathan Jesús Kevin Guerrero Rodriguez

LAMBAYEQUE – PERÚ

2020



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**



“Diversidad genética y resistencia molecular del VIH-1 que infecta a militares peruanos de Lima y Callao, 2015 - 2018”

TESIS

Para optar el título profesional de Licenciado en:

Biología - Microbiología - Parasitología

PRESENTADO POR:

Br. Jonathan Jesús Kevin Guerrero Rodriguez

ASESORES:

Dra. Martha Arminda Vergara Espinoza

Dr. Carlos Augusto Yabar Varas

LAMBAYEQUE – PERÚ

2020



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**



“Diversidad genética y resistencia molecular del VIH-1 que infecta a militares peruanos de Lima y Callao, 2015 - 2018”

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA

APROBADO POR:

Dra. Ana María del Socorro Vásquez del Castillo

JURADO, Presidente

Dr. Luis Alberto Rodríguez Delfín

JURADO, Secretario

Lic. Mario C. Moreno Mantilla

JURADO, Vocal

Dra. Martha Arminda Vergara Espinoza

PATROCINADORA

LAMBAYEQUE – PERÚ 2020

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por permitirme conocer a buenas personas que me ayudaron a culminar esta tesis.

Agradezco a mi familia por apoyarme y empujarme a lograr mis metas, siendo esta una de ellas.

Agradezco al Instituto Nacional de Salud, en especial al LRN VTS-VIH/SIDA, por permitirme realizar esta tesis en sus instalaciones. Al Dr. Carlos Yabar, mi asesor, por recibirme e integrarme a su equipo de trabajo en el Área de Genotipificación del VIH, de la misma manera a la Blga. Susan Espetia y a mis amigos Giovanni, Estela, Pamela y Mariela, por transmitirme siempre su buen ánimo y sus buenas vibras. ¡Muchas gracias amigos!

Agradezco también a la Blga. Fany Cárdenas y a la Blga. Soledad Romero, por darme la oportunidad de trabajar a su lado y crecer tanto profesional como personalmente.

Agradezco finalmente a la Dra. Martha Vergara, mi asesora, gracias por trasmitirme su pasión por la Microbiología y por la Investigación. Siempre estaré en deuda con usted.

¡GRACIAS TOTALES!

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a mis padres, Irma Rodriguez y Hugo Guerrero, y a mi hermana, Jazmín, todos mis logros son para ustedes. Gracias por su amor, dedicación y paciencia.

Dedico también esta tesis, a mi abuela Violeta Astudillo, por su amor, comprensión y sobre todo por consentirme mucho.

Dedico esta tesis finalmente a la memoria de mi abuelo Nicanor Guerrero. Gracias por ser mi mejor amigo.

“Podemos adquirir experiencia del pasado, pero no podemos revivirlo; y podemos esperar por el futuro, pero no sabemos si hay uno”.

George Harrison

“Y tómese en cuenta que uno puede recuperar el dinero, el amor, el prestigio o cualquier cosa que haya perdido... menos el tiempo”.

Roberto Gómez Bolaños

Contenido

Resumen	i
Abstract.....	ii
Lista de Tablas.....	iii
Lista de Figuras	v
Lista de abreviaturas	vi
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1. Antecedentes de la investigación	3
2.2. Bases teóricas.....	8
3. Materiales y métodos	10
3.1. Materiales.....	10
3.2. Métodos	11
4. Resultados	23
4.1. Identificación de los subtipos y formas recombinantes del VIH-1.....	23
4.2. Determinación de la diversidad genética en los genes <i>gag</i> y <i>pol</i> , y recombinación genética del VIH-1.....	27
4.3. Identificación de mutaciones de resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales.	29
4.4. Determinación del perfil epidemiológico y estado clínico de la población militar	39
4.5. Análisis estadístico	43
5. Discusión.....	51
6. Conclusiones	54
7. Recomendaciones.....	55
8. Referencias bibliográficas	56
9. Anexos.....	65

Resumen

Objetivo. Determinar la diversidad genética y resistencia molecular del VIH-1 en militares peruanos de Lima y Callao, 2015 – 2018.

Materiales y métodos. Estudio longitudinal a partir de 104 muestras provenientes de 52 militares peruanos, en dos tiempos con un intervalo de uno a tres años de diferencia. Se extrajo el ADN proviral, el cual fue sometido a PCR para la amplificación de los genes *gag* y *pol* del VIH-1. Los productos de la PCR fueron purificados, secuenciados y analizados mediante herramientas de bioinformática para la identificación de los subtipos mediante análisis filogenético, la determinación de la diversidad genética, recombinación genética y mutaciones de resistencia a los antirretrovirales (ARVs).

Resultados. Se demostró que, del total de muestras analizadas el 97.8% fueron subtipo B con evidencia de recombinación genética entre diferentes subtipos, siendo el gen *gag* el que presentó más eventos recombinantes (primer tiempo: 10.9% y el segundo tiempo: 8.7%), a través de una forma recombinante circulante de tipo CRF02_AG. Se evidenció un aumento en la diversidad genética en el segundo tiempo a 0.045609 mediante el Test D de Tajima. Con relación al análisis de la resistencia a los antirretrovirales (ARVs) se determinó que el mayor índice de resistencia fue frente al Abacavir (ABC), el cual en un intervalo de tiempo de uno a tres años aumentó a 23.9%. Así mismo, se identificó que las mutaciones más prevalentes fueron M41LM (6.5%), M184MV (6.5%) y L210LW (8.7%) que confieren resistencia a todos los INTR, y la mutación M184V (8.7%) relacionada con un alto nivel de resistencia a Lamivudina (3TC) y Emtricitabina (FTC). Otras mutaciones relacionadas con la resistencia a IP fueron M46IM, I54V, V82AV y L90LM que mostraron un índice de 2.2%. Finalmente, se identificó la mutación Y188YFHL (2.2%), relacionada con resistencia a todos los INNTR.

Conclusiones. Este trabajo demuestra que las mutaciones que confieren resistencia a los antirretrovirales seleccionados como consecuencia del tratamiento antirretroviral, incrementan la diversidad genética del VIH-1 en la población militar.

Palabras clave: VIH-1, diversidad genética, recombinación genética, resistencia a los antirretrovirales, población militar.

Abstract

Objective. Determine the genetic diversity and molecular resistance of HIV-1 in Peruvian military in Lima and Callao, 2015 - 2018.

Materials and methods. Longitudinal study based on 104 samples from 52 Peruvian soldiers, in two stages with an interval of one to three years apart. Proviral DNA was extracted, which was subjected to PCR for amplification of the gag and pol genes of HIV-1. The PCR products were purified, sequenced and analyzed using bioinformatics tools for the identification of subtypes by phylogenetic analysis, the determination of genetic diversity, genetic recombination and antiretroviral resistance mutations (ARVs).

Results. It was shown that, of the total samples analyzed, 97.8% were subtype B with evidence of genetic recombination between different subtypes, with the gag gene having the most recombinant events (first half: 10.9% and the second half: 8.7%), a through a circulating recombinant form of type CRF02_AG. An increase in genetic diversity was evidenced in the second half at 0.045609 by the Tajima D Test. Regarding the analysis of antiretroviral resistance (ARVs), it was determined that the highest resistance index was against Abacavir (ABC), which in a time interval of one to three years increased to 23.9%. Likewise, it was identified that the most prevalent mutations were M41LM (6.5%), M184MV (6.5%) and L210LW (8.7%) that confer resistance to all INTRs, and the M184V mutation (8.7%) related to a high level of resistance to Lamivudine (3TC) and Emtricitabine (FTC). Other mutations related to IP resistance were M46IM, I54V, V82AV and L90LM that showed an index of 2.2%. Finally, the Y188YFHL mutation (2.2%), related to resistance to all NRTIs was identified.

Conclusions. This work demonstrates that mutations that confer resistance to selected antiretrovirals as a result of antiretroviral treatment increase the genetic diversity of HIV-1 in the military population.

Keywords: HIV-1, genetic diversity, genetic recombination, resistance to antiretrovirals, military population.

Tabla 1. Lista de primers utilizados para la amplificación de los genes <i>gag</i> y <i>pol</i> del VIH-1	13
Tabla 2. Condiciones de ciclado para la amplificación del gen <i>gag</i> del VIH-1.....	15
Tabla 3. Primers utilizados para la amplificación del gen de la β -globina.....	17
Tabla 4. Sensibilidad de la PCR de los productos amplificados de los genes <i>gag</i> y <i>pol</i> del VIH-1 de los militares peruanos.....	23
Tabla 5. Análisis de la diversidad genética mediante el Test D de Tajima de los marcadores <i>gag</i> y <i>pol</i> del VIH-1 en ambos tiempos.....	28
Tabla 6. Análisis de la diversidad genética mediante el Test D de Tajima de los marcadores concatenados <i>gag-pol</i> del VIH-1 en ambos tiempos.....	28
Tabla 7. Eventos de recombinación genética en los genes <i>gag</i> y <i>pol</i> del VIH-1 en ambos tiempos.	29
Tabla 8. Frecuencia de mutaciones de resistencia del VIH-1 a los Inhibidores de la Proteasa en el primer tiempo.....	31
Tabla 9. Frecuencia de mutaciones de resistencia del VIH-1 a Inhibidores de la Proteasa en el segundo tiempo.....	32
Tabla 10. Frecuencia de mutaciones de resistencia del VIH-1 a los Inhibidores no Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa en ambos tiempos.	33
Tabla 11. Frecuencia de mutaciones de resistencia del VIH-1 a los Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa en el primer tiempo.....	34
Tabla 12. Frecuencia de mutaciones de resistencia del VIH-1 a los Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa en el segundo tiempo.	35
Tabla 13. Análisis de resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales durante el primer tiempo.	37
Tabla 14. Análisis de resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales durante el segundo tiempo.	38
Tabla 15. Perfil epidemiológico de militares peruanos de Lima y Callao infectados con VIH-1, 2015 - 2018.....	40
Tabla 16. ANOVA de los Inhibidores de la Proteasa en ambos tiempos.	44

Tabla 17. ANOVA de los Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa en ambos tiempos.	45
Tabla 18. ANOVA de los Inhibidores no Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa en ambos tiempos.	46
Tabla 19. Descripción de frecuencias y porcentajes de las variables epidemiológicas en los militares peruanos con VIH-1 de Lima y Callao, 2015 – 2018.	48
Tabla 20. Descripción de frecuencias y porcentajes de los subtipos del VIH-1 en los militares peruanos de Lima y Callao, 2015 – 2018.	49
Tabla 21. Descripción de frecuencias y porcentajes del recuento de CD4 (células/mL) en los militares peruanos de Lima y Callao, 2015 – 2018.	49
Tabla 22. Descripción de frecuencias y porcentajes de la carga viral (copias/mL) del VIH-1 en los militares peruanos de Lima y Callao, 2015 – 2018.	50

Figura 1. Situación epidemiológica del VIH/SIDA en el Perú. Casos acumulados de VIH y SIDA notificados (1983 - 2018)	4
Figura 2. Amplificación de los productos de la PCR de los genes <i>gag</i> , <i>pol</i> y β -globina	24
Figura 3. A) Árbol filogenético del gen <i>pol</i> del VIH-1 en la población militar (ambos tiempos). B) Árbol filogenético del gen <i>gag</i> del VIH-1 en la población militar (ambos tiempos)	25
Figura 4. Árbol filogenético de los genes concatenados <i>gag-pol</i> del VIH-1 en la población militar (ambos tiempos).....	26
Figura 5. Carga viral (log 10) del VIH-1 de la población militar en ambos tiempos de toma de muestra.....	41
Figura 6. Recuento de CD4 (células/mL) de la población militar en ambos tiempos de toma de muestra.....	42

Lista de abreviaturas

°C	Grados centígrados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARV	Antirretroviral
CD4	Molécula de grupo de diferenciación 4
CD8	Molécula de grupo de diferenciación 8
CDC	Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades
dNTP	Deoxinucleótidostrifosfato
dATP	Deoxiadenosintrifosfato
dCTP	Deoxicitosintrifosfato
dGTP	Deoxiguanidintrifosfato
dTTP	Deoxitimidintrifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
<i>Env</i>	Gen de la envoltura
<i>Gag</i>	Gen antígeno específico
HSH	Hombres que tienen sexo con otros hombres
<i>In</i>	Gen de la Integrasa
INNTR	Inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa
INTR	Inhibidores nucleósidos de la transcriptasa reversa
IP	Inhibidores de la proteasa
ITS	Infección de transmisión sexual
kb	Kilobase
N	Normalidad
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanogramos

nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Población militar
<i>Pol</i>	Gen de la polimerasa
<i>Prt</i>	Gen de la proteasa
Rpm	Revolución por minuto
RC	Capacidad replicativa
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia humana
TAE	Tris-Ácido acético EDTA
TAR	Terapia o tratamiento antirretroviral
TS	Trabajador(a) sexual
<i>RT</i>	Gen de la transcriptasa reversa
µg	Microgramo
µL	Microlitro
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

1. Introducción

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) causante del SIDA, fue aislado en 1983 a partir de células del nódulo linfático de un paciente con linfadenopatía (Cherman *et al.*, 1983), cuya característica más importante es la destrucción del sistema inmune, pero también origina manifestaciones neurológicas y tumorales, debido al doble tropismo del VIH; por un lado, infecta a las células de la estirpe macrofágica y por otro, presenta un tropismo especial por los linfocitos CD4 (Codina *et al.*, 2002). La gran homología en la secuencia nucleotídica, así como las similitudes morfológicas, demostraron que el virus era evolutivamente similar a miembros del género *Lentivirus* de la familia *Retroviridae* (Gonda *et al.*, 1985). Desde entonces se ha visto al SIDA, como una enfermedad que en un principio fue reportada en países desarrollados, en hombres que tienen sexo con otros hombres (HSH) y usuarios de drogas intravenosas, convirtiéndose en una pandemia que afecta a millones de adultos y niños de todos los continentes (Coffin, 1995).

El VIH-1, muestra una alta tasa de variabilidad e inestabilidad genética, basando su estrategia adaptativa en dos criterios, la mutación y la selección natural (Casañas, 2008). La tasa de mutación, representa al número de bases incorrectamente incorporadas por la enzima, la que se estima en 10^{-3} a 10^{-5} sustituciones por nucleótidos (s/nt) por ronda de copia (Drake *et al.*, 1998; Domingo E. and Holland JJ, 1997), esto debido a la ausencia de la capacidad correctora de la transcriptasa reversa (exonucleasa 3'-5') asociada a muchas ADN polimerasas (Soriano V, *et al.*, 1999). A su vez, en el hospedador se producen una serie de presiones selectivas, como la respuesta inmune, que fuerza a la población viral con mayor capacidad replicativa a adaptarse mejor al ambiente (cuellos de botella), mientras que, el tratamiento antirretroviral, otro tipo de presión selectiva (añadida o externa) afecta la dinámica poblacional y selecciona a las variantes con resistencia a fármacos, pero sin eliminar por completo a las poblaciones sensibles, las que permanecen en reservorios hasta un cambio en la terapia antirretroviral, donde pueden volver a predominar (Nájera *et al.*, 1995; Casañas, 2008).

De otro lado, la generación de cepas recombinantes constituye una fuente adicional de variación del VIH-1, las que pueden ser: intrasubtipo, recombinación entre diferentes cepas del mismo subtipo; intersubtipo, entre distintos subtipos; e intergrupo, entre diferentes grupos. Por lo tanto, la recombinación, desempeña un papel importante en la evolución y la

expansión geográfica del VIH (Clavel *et al.*, 1989; Hu WS and Temin HM, 1990; Gómez, 2012).

En el Perú, la infección por el VIH, continúa siendo en la actualidad un importante problema en la salud pública (Figura 1), catalogada a la enfermedad como concentrada y con una prevalencia del 0.23% en la población general (Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades: Boletín diciembre, 2018). En el 2004, ha sido fundamental el inicio de la administración terapéutica de antirretrovirales (TAR), ya que ha disminuido la mortalidad en los individuos infectados (MINSA, 2006), pero generando cepas resistentes a los medicamentos, por lo que, en el 2008 se implementaron las pruebas de genotipificación, surgiendo la necesidad de identificar la presencia de mutaciones en el genoma del VIH-1 (Boletín Instituto Nacional de Salud, 2008), teniendo los primeros estudios de genotipificación del VIH en el Perú, en población militar y HSH (Yabar *et al.*, 2006; Lama *et al.*, 2006), identificándose además al subtipo B como el más frecuente con un porcentaje del 97% (Russell *et al.*, 2000).

Es por ello, que se planteó el siguiente problema: ¿Existe un incremento en la diversidad genética y la resistencia molecular del VIH-1 en militares peruanos de Lima y Callao, durante un intervalo de tiempo de uno a tres años de seguimiento? La constante evolución del VIH-1 ha permitido la aparición de mutaciones de resistencia, generando cepas resistentes a las diferentes clases de antirretrovirales (ARVs), además de la generación de nuevas variantes recombinantes (Rambaut *et al.*, 2004; Tebit *et al.*, 2007), de esto surge la siguiente hipótesis: Existe un incremento en la diversidad genética y la resistencia molecular del VIH-1 en militares peruanos de Lima y Callao, durante un intervalo de tiempo de uno a tres años de seguimiento.

Por todo lo afirmado se ejecutó la presente investigación que tiene como objetivos:

✓ Objetivo principal:

Determinar la diversidad genética y la resistencia molecular del VIH-1 en militares peruanos de Lima y Callao, durante un intervalo de tiempo del 2015 – 2018.

✓ **Objetivos específicos:**

Identificar los subtipos y formas recombinantes del VIH-1 que infecta a militares peruanos de Lima y Callao entre los años 2015 – 2018.

Determinar la diversidad genética en los genes *gag* y *pol* y la recombinación genética del VIH-1 en militares peruanos de Lima y Callao durante el periodo 2015 – 2018.

Identificar mutaciones de resistencia a los antirretrovirales en militares peruanos infectados por el VIH-1 de Lima y Callao entre los años 2015 – 2018.

Determinar el perfil epidemiológico y el estado clínico de los militares peruanos de Lima y Callao, durante un intervalo de tiempo del 2015 – 2018.

2. Marco teórico

2.1. Antecedentes de la investigación

Laguna-Torres y colaboradores en el 2005, determinaron la distribución de los subtipos del VIH-1 y la presencia de cepas recombinantes en Argentina, Bolivia, Colombia, Chile, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela a través de estudios epidemiológicos y de genotipificación donde se utilizó la prueba de movilidad heteroduplex de envoltura (*env* HMA), ProRT, secuenciamiento completo o ambas para determinar los subtipos de VIH-1. Se encontró el subtipo B en 1380 (83%) muestras, el subtipo F en 218 (13%), así como los subtipos A y C en 0,1% y 0,4% respectivamente. Se hallaron subtipos recombinantes BF en 39 muestras (2%) y formas recombinantes CRF01_AE (0,1%), CRF17_BF (0,4%) y CRF02_AG (0,1%). Por lo que concluyeron que en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile (países andinos) predomina el subtipo B, mientras que en Argentina, Uruguay y Paraguay hubo un alto porcentaje del subtipo F.

Particularmente en el Perú los casos de VIH/SIDA se han acumulado desde el año 1983 hasta el 2018; asimismo, según el Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de enfermedades del Ministerio de Salud del Perú, las regiones Costera y Selvática son las que presentan un mayor número de casos acumulados, destacando las ciudades de Lima y Callao con una prevalencia del 70% de los casos a nivel nacional (Figura 1).

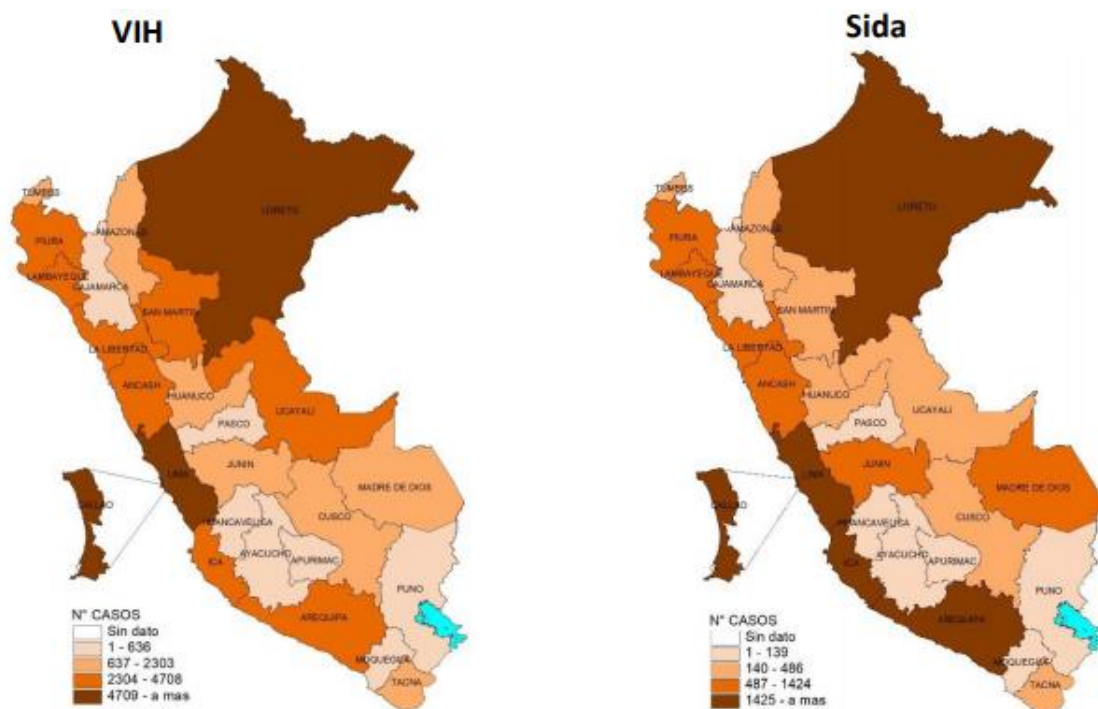


Figura 1. Situación epidemiológica del VIH/SIDA en el Perú. Casos acumulados de VIH y SIDA notificados (1983 - 2018). Fuente: Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades - Ministerio de Salud del Perú. Casos notificados al 31/12/2018.

Así mismo, un estudio realizado por Yabar y colaboradores en el 2008 en Perú, para determinar la diversidad genética del VIH-1 en trabajadores sexuales, contó con la participación de 147 sujetos infectados del que se extrajo ADN de células mononucleares de sangre periférica para amplificar un fragmento de 460 pb correspondiente a la región p24-p7 del gen *gag*. El producto de PCR se dirigió con enzimas de restricción para identificar el polimorfismo genético. Luego se secuenció un grupo de 19 muestras para realizar análisis filogenético, recombinación intragénica y mutaciones deletéreas que conducen a una proteína no funcional en las regiones conservadoras de la proteína *gag*.

El análisis filogenético reveló una dominancia del subtipo B, por otro lado, el análisis de recombinación intragénica mostró un caso de recombinación B/C de una mujer trabajadora sexual (bootstrap = 1000, valor de $p < 0,05$) y por último se observaron mutaciones deletéreas en tres casos de dominios conservadores de dedos de Zinc para *gag* (3/19) y un caso de la región de alta homología (1/9). Por lo tanto, en este estudio muestra

que el VIH-1 que circula en esta población tiene un alto polimorfismo genético que implica mutaciones deletéreas en dominios conservados de la región *gag* p24-p7.

De igual manera, Guimarães y colaboradores en el 2012, realizaron un estudio de análisis filogenético a partir de muestras colectadas en Bolivia en dos puntos diferentes en un lapso de tiempo de 10 años para estimar las tendencias del subtipo de VIH y las formas recombinantes. 50 muestras VIH-1 seropositivas fueron colectadas en Bolivia en dos periodos distintos (1996 y 2005). Estas muestras fueron caracterizadas genéticamente basadas en la región parcial *pol* *proteasa*/ *transcriptasa reversa* (*prt/rt*) y en la región *env*. El análisis filogenético de ambas regiones *env* y *pol* confirmaron la predominancia de muestras puras subtipo B (72.5%) circulantes en Bolivia y reveló una alta prevalencia de genotipos BF1 (27.5%). 11 de 14 recombinantes BF1 desplegaron una estructura mosaico idéntica o similar a la descrita por la variante CRF12_BF, una muestra fue clasificada como CRF17_BF, y otras dos fueron F1 *pol*/B *env*. La diversidad genética del VIH-1 en Bolivia es mayormente conducida por el subtipo B, seguida de las cadenas recombinantes BF1 de la familia CRF12_BF.

Otro estudio realizado por Yabar y colaboradores en el 2012 a un grupo de 267 pacientes del Programa Nacional de Tratamiento peruano con falla virológica fueron evaluados para pruebas genotípicas de resistencia al VIH, donde se extrajo ARN viral del plasma y los segmentos de los genes de proteasa (*prt*) y transcriptasa inversa (*rt*) se amplificaron mediante RT-PCR, se purificaron y secuenciaron por completo. El análisis obtenido del programa HIVdb mostró 81.5% de casos de resistencia (n=198). El análisis filogenético reveló que el subtipo B era predominante en la población (98.8%), excepto en los casos nuevos de subtipos A, C y H (n=4). De estos casos, solo se importó el subtipo C. Del mismo modo, el análisis de recombinación reveló nueve casos recombinantes intersubtipo y veinte intrasubtipo.

En relación a las mutaciones de resistencia a los antirretrovirales, Wainberg en el 2004, indica cómo la introducción de una terapia subóptima y la mala adherencia del paciente pueden conducir a una aparición más rápida de variantes resistentes. Así se tiene como las

mutaciones Y181C y Y181I, respectivamente, pueden representar el grupo O de VIH-1 y todas las cepas de VIH-2 resistentes a todos los fármacos dentro de la clase completa de los Inhibidores No Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa (INNTR). De manera menos absoluta, el subtipo F muestra cierta medida de resistencia a un INNTR no comercializado, el compuesto TIBO, mientras permanece sensible a otros INNTR, como nevirapina y delavirdina, así como a los Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa (INTR) y los Inhibidores de la Proteasa (IP). En contraste, algunos aislados de subtipo C pueden mostrar resistencia inherente contra INNTR debido a la presencia natural de un polimorfismo G190A.

En las variantes resistentes al subtipo C seleccionadas con nevirapina, también se generaron otros cambios de aminoácidos, incluidos A98I, A98S, K103N, V106M, V108I y Y181C. Un polimorfismo de referencia en el codón 106 en los virus de subtipo C facilitó el desarrollo de una nueva mutación V106M que confiere resistencia a efavirenz, así como a otros miembros de la clase de fármacos INNTR. La base para esta diferencia indica que la presión de selección con INNTR puede favorecer diferentes patrones de escape mutacional de estos fármacos en el subtipo B frente a los virus de subtipo C.

De otra manera, Santos y Soares en el 2010, mencionaron que la adquisición de resistencia viral a menudo implica modificaciones estructurales dentro o cerca del sitio activo de la enzima, permitiendo que la proteína discrimine mejor su sustrato natural en el entorno restrictivo impuesto por las drogas. El costo de esta ventaja generalmente se paga a través de la pérdida de la capacidad de replicación. Así demostraron que los virus de subtipo B con D30N o L90M solo tenían una pérdida marginal de capacidad replicativa (RC) de aproximadamente 10% en relación con el virus de tipo salvaje. Por otro lado, el impacto fue más severo en el subtipo C, en el cual la presencia de L90M causó una pérdida en RC del 20%. El subtipo C con D30N solo no fue capaz de replicarse en cultivo celular. El alto costo replicativo de D30N en el subtipo C podría correlacionarse con su baja adquisición en ese subtipo.

Otro ejemplo bien documentado de cómo las mutaciones específicas pueden afectar de manera diferente la replicación del virus es causado por las vías TAM (Mutaciones de Análogos de Timina) en VIH-1 subtipos B y C. La presencia de mutaciones D67N y K70R no afectó la aptitud del subtipo B, pero aumentó la capacidad replicativa en el subtipo C. De manera similar, el mutante doble M41L / T215Y no afectó al subtipo C, pero afectó sobre la aptitud del subtipo B.

En algunos casos, una sola mutación puede conducir a la resistencia cruzada a todos los medicamentos dentro de una clase de drogas determinada. Este es el caso de las mutaciones L100I e Y181I / C en la transcriptasa reversa, que confieren resistencia a todos los INNTR, y para I84V en proteasa que da como resultado la pérdida de actividad de cinco de ocho IP disponibles. Diferentes grupos y subtipos de VIH llevan en sus genomas firmas genéticas y polimorfismos que podrían alterar la estructura de las proteínas virales que son atacadas por los fármacos, lo que perjudica la unión y eficacia del ARV, así se tiene por ejemplo a mutaciones asociadas a drogas de los subtipos no-B del VIH-1 resistentes a los IP: I13V, K20I, M36I, H69K, V82I, I93L.

Las pruebas periódicas al personal militar, sugiere una identificación temprana a la infección, lo que ayuda a describir la evolución de la epidemiología molecular de la transmisión del VIH-1, mencionado por Brodine y colaboradores en 1999, los que realizaron un estudio en 95 pacientes entre febrero de 1997 y febrero de 1998 en el Hospital de referencia militar (EE. UU), donde lograron identificar a siete pacientes con el subtipo E (7.4%), mientras que el resto presentó el subtipo B. El 26% de los pacientes sin tratamiento previo presentaron mutaciones en la transcriptasa inversa o el gen de la proteasa asociados con la resistencia a los ARVs. Por lo tanto, el porcentaje de infección por VIH-1 y de mutaciones con resistencia a los ARVs fue relativamente alto en el personal militar de EE.UU. con infección recientemente adquirida.

Otro estudio, donde también involucran a militares estadounidenses sin tratamiento previo, realizado por Wegner y colaboradores en el 2000, se encontró una prevalencia del 15% de resistencia a INNTR, 4% para los INTR y el 10% para IP de un total de 114 sujetos

infectados por el VIH-1. Por otro lado, Babajide y colaboradores en el 2017, realizaron un estudio en cuatro hospitales militares Nigerianos, para evaluar la supresión virológica y resistencia en pacientes con tratamiento antirretroviral, observándose mutaciones de resistencia a los INNTR, dentro de ellas: M184V, K103N y Y188C, mientras que hubieron pacientes que no tomaron Zidovudina y presentaban más de dos mutaciones análogas de Timina (TAM), a su vez, 35 de los 44 participantes presentaron un carga viral > 1000 copias/ml, demostrando que es importante el monitoreo virológico para la detección temprana del fracaso al tratamiento. Así mismo, Yabar y colaboradores en el 2006, demostraron la existencia de mutaciones de resistencia a los ARVs a nivel de *rt* y *prt*, en militares peruanos que reciben terapia. En *rt*, encontraron a las mutaciones T215Y y la M184V, relacionadas en conferir resistencia a la Zidovudina (AZT) y Estavudina (D4T), así como a Lamivudina (3TC) y Emtricitabina (FTC) respectivamente, mientras que en *prt*, observaron las mutaciones D30N y N88D, implicadas en conferir resistencia a Nelfinavir (NFV).

2.2. Bases teóricas

El VIH-1 se destaca por la diversidad de cepas que componen la pandemia del VIH/SIDA (CENSIDA, 2009). La presencia de un subtipo genético circulando en una región representa un alto riesgo para la generación de formas recombinantes, las cuales se caracterizan por presentar una mayor capacidad replicativa (Tebit *et al.*, 2007) y albergar mutaciones de resistencia a ARVs provenientes de múltiples cepas resistentes (Rambaut *et al.*, 2004). Asimismo, se ha determinado que la diversidad y la evolución del gen *gag* guarda relación con la carga viral (capacidad replicativa) y progresión de la enfermedad (capacidad infectiva) en el hospedero humano a diferencia del gen *env* (Piantadosi *et al.*, 2009), hallazgos que podrían estar relacionados con las diferentes regiones conservadas de *gag*, ya que uno de sus dominios corresponde a la porción p24-p7 que se caracteriza por presentar una región de dedos de Zinc, implicado en diferentes procesos de la replicación tales como la unión específica de la proteína *gag* con el ARN viral (Urbaneja *et al.*, 1999), en la síntesis de la hebra complementaria durante la transcripción reversa (Cen *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 1999), el ensamblaje y maduración del virus (Dawson, 1998).

Los análisis del virus de diferentes subtipos han revelado muchos cambios de nucleótidos (mutaciones silenciosas), polimorfismos y mutaciones secundarias en las regiones del gen *pol* (*rt* y *pvt*) que están implicadas en la aparición de resistencia a inhibidores nucleósidos e inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (INTI e ITINN), así como inhibidores de la proteasa (IP) y más recientemente la inhibición de la entrada viral en células susceptibles utilizados en el tratamiento del VIH-1. Tal terapia ha reducido significativamente la transmisión del virus, la morbilidad y la mortalidad, pero también ha conducido al problema de la resistencia a los medicamentos (Yabar *et al.*, 2006).

Es así, como la resistencia a los ARVs se puede evidenciar de dos maneras: transmitida y adquirida. La resistencia del tipo transmitida ocurre en individuos que no estuvieron anteriormente infectados por VIH o que no reciben TAR y que son infectados con virus resistentes a drogas, mientras que la resistencia adquirida, ocurre cuando aparecen mutaciones de resistencia por la presión selectiva impuesta por el TAR (WHO, 2016). Para conocer, el perfil de resistencia a los ARVs, se requiere realizar la metodología de Genotipificación del VIH, técnica molecular basada en el secuenciamiento de la región *pol* para el análisis de la proteasa y transcriptasa reversa (Shafer, 2002).

En algunos países de Sudamérica como Argentina, Brasil y Chile, se emprendió el estudio para la detección molecular de resistencia a ARVs en VIH con la aprobación del Ministerio de Salud (Avila-Rios *et al.*, 2016). Así mismo, viendo la necesidad de vigilar la resistencia en pacientes vírgenes al tratamiento, se iniciaron los estudios de resistencia transmitida en países de América Latina y el Caribe, cuya prevalencia se encontró en el rango de 2.8% a 8.1% entre los años 2003 y 2010 (Myers *et al.*, 2012). En tanto que, en la región Andina fue del 10.5% durante los años 1999 y 2007 (Pineda *et al.*, 2012). Así mismo, los primeros estudios de genotipificación del VIH en el Perú, se llevaron a cabo en población militar y HSH, donde a pesar que el tamaño muestral en la población de militares peruanos fue reducido, se logró identificar tres casos de resistencia adquirida (Yabar *et al.*, 2006), mientras que para la población HSH fue 31.3% junto con el 3.3% de resistencia transmitida (Lama *et al.*, 2006).

Por otro lado, estudios mostraron evidencias en pacientes con conducta de alto riesgo de infección por VIH como es el grupo de trabajadoras y trabajadores sexuales (TS), los que presentan un real protagonismo en la distribución de los subtipos de VIH-1. En Asia se confirmó la introducción del subtipo E en Myanmar proveniente de Tailandia en militares infectados por TS femeninas (Nopkesorn *et al.*, 1998). A su vez, en el Perú los primeros estudios realizados en una población con alto riesgo (Trabajadoras sexuales) determinaron al subtipo B como el más prevalente con un 100% (Yabar *et al.*, 2007), lo que sugiere que este grupo de riesgo podría estar jugando un rol importante en la distribución y transmisión del subtipo B en todo el país (Yabar, 2017).

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Material biológico

El tipo de muestra biológica correspondió a sangre venosa tratada con anticoagulante obtenida a partir del antebrazo de los militares peruanos infectados (VIH - positivos) para el análisis del material genético del virus. Además, se incluyó como ADN control de la PCR a la cepa HXB2, subtipo B de referencia.

3.1.2. Población y muestra

Se consideraron 104 muestras de sangre provenientes de 52 militares peruanos infectados con VIH-1 de Lima y Callao, durante el período 2015 – 2018, de los que se obtuvo dos (02) tomas de muestra en diferentes períodos de tiempo para ser almacenadas y luego utilizadas en esta investigación.

3.1.2.1. Criterios de selección

Criterios de inclusión

- Muestras de sangre almacenadas a -80°C y correctamente rotuladas con las iniciales PM seguida de un número correspondiente al paciente.

- Muestras de sangre que presenten doble incursión al laboratorio (tanto la primera como la segunda toma de muestra) con al menos 6 meses de diferencia entre ambas.

Criterios de exclusión

- Muestras de sangre sin información de recuento linfocitario y carga viral en ambos períodos de tiempo.

3.2. Métodos

3.2.1. Variables

Variables dependientes:

Diversidad genética.

Resistencia molecular a los antirretrovirales.

Variable independiente

Tiempo (Período 2015 – 2018).

Variables intervinientes:

Edad, TAR, tiempo de infección, uso de preservativo, contacto sexual con trabajadores sexuales (TS), consumo de drogas, recuento de CD4 y carga viral del VIH-1.

3.2.2. Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

La presente tesis corresponde a un estudio descriptivo con diseño longitudinal de análisis de cohorte que permitió describir los subtipos o formas recombinantes que circulan en esta población y las mutaciones que confieren resistencia a los antirretrovirales; para la contrastación de hipótesis y el valor del índice P, se consideró un intervalo de confianza del 95%. Complementariamente, se obtuvo a partir de las historias clínicas de los militares peruanos los siguientes datos: el recuento linfocitario de CD4 y la carga viral del VIH-1 (Estudio bibliográfico).

3.2.3. Obtención de muestras

Las muestras sangre en la presente investigación se obtuvieron mediante la autorización de uso del material biológico para las investigaciones en el Centro Nacional de Salud Pública del Instituto Nacional de Salud (Anexo 1).

3.2.4. Procedimiento.

A) Identificación de los subtipos y formas recombinantes del VIH-1: Se siguió el método de Genotipificación del VIH - INS, 2017.

A.1. Amplificación de los genes *gag* y *pol* del VIH-1.

1) Aislamiento del material genético

La extracción del ARN o ADN proviral se realizó utilizando el kit comercial Thermo Scientific GeneJET tomando un volumen de 200 µl de plasma del criovial original. La muestra fue sometida a una solución de lisis para la liberación del material genético, seguida de lavados con etanol al 70% y *Buffers* de lavado. El ácido nucleico fue removido de las columnas de purificación proveídas por el kit mediante centrifugación utilizando un *Buffer* con inhibidor de ARNasas como diluyente. Finalmente, el ARN o ADN proviral fue almacenado a -80°C para los análisis siguientes (Anexo 2).

2) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Todos los procedimientos de PCR fueron realizados utilizando el termociclador AnalytikJena. Cada reacción fue llevada a cabo utilizando diferentes sets de *primers* de acuerdo al gen de interés (Tabla 1).

Tabla 1. Lista de primers utilizados para la amplificación de los genes *gag* y *pol* del VIH-1

Gen amplificado	Nombre del primer	Secuencia	Posición en el genoma	Tamaño en pb	Referencia
<i>Gag</i> (p24 - p7)	H1G777	5'- TCA CCT AGA ACT TTG AAT GCA TGG G -3'	777-801	460 pb	Vander Auwera & Heyndrick., 2000
	H1P202	5'- CTA ATA CTG TAT CAT CTG CTC CTG T -3'	1874-1898		
	H1Gag1584	5'- GGG CCC AAA GAT GGA TAA TCC TGG G -3'	1123-1141		
	g17	5'- GGC GCC ACA TTT CCA ACA GCC CTT TTT -3'	1566-1589		
<i>Pol</i> (Unión de la proteasa y transcriptasa reversa)	RT-21	5'-CTG TAT TTC TGC TAT TAA GTC TTT TGA TGG G-3'	2028-2050	1200 pb	Yabar <i>et al.</i> , 2012; Li <i>et al.</i> , 2006
	1243	5' – ACT AAG GGA GGG GTA TTG ACA AAC TC-3'	3792-3817		
	MAW-26	5'-TTGGAAATGTGGAAAGGAAGGAC-3'	2028-2050		
	PRO-1	5'-CAG AGC CAA CAG CCC CAC CA-3'	2147-2166		
	RT-20	5'-CTG TAT TTC TGC TAT TAA GTC TTT TGA TGG G-3'	3441-3462		
	1205	5' – CCA GGT GGC TTG CCA ATA CTC TGT CC-3'	3754-3779		
	MAW-46	5'-TCCCTCAGATCACTCTTTGGCAACGAC-3'	2251–2277		
	RT-A	5'-GTTGACTCAGATTGGTTGCAC-3'	2519–2539		
	RT-B	5'-CCTAGTATAAACAATGAGACAC-3'	2946–2967		

2.1) Amplificación de la región *p24-p7* del gen *gag*. Metodología desarrollada por Van der Auwera & Heyndrick, 2000.

Región seleccionada para el análisis de subtipos, recombinación molecular y mutaciones relacionadas con la capacidad infectiva del VIH-1. Para tal fin se emplearon dos rondas de amplificación, así mismo, se utilizaron tres condiciones de ciclado (Tabla 2) con el objetivo de incrementar la sensibilidad de la reacción.

- **Primera ronda:** se utilizaron tubos para PCR con capacidad de 200 μ L debidamente rotulados conteniendo concentraciones finales de los siguientes componentes: *Buffer* de reacción de PCR 1X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3), 2.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de mezcla de deoxinucleótidos trifosfatos (200 μ M de dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 0.2 pmoles de los *primers* H1G777 y H1P202, 0.025 U de Enzima Taq ADN Polimersa High Fidelity, y 100ng de ADN molde. Se utilizaron diferentes condiciones de ciclado con una temperatura de almacenaje de 4°C hasta el momento de dar inicio a la segunda ronda de PCR o fueron almacenados a una temperatura de -20°C durante toda la noche.
- **Segunda ronda:** en la cual se mezclaron concentraciones finales de los siguientes reactivos: *Buffer* de reacción de PCR 1X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3), 3.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de mezcla de deoxinucleótidos trifosfatos (200 μ M de dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 0.4 pmoles de los *primers* H1Gag1584 y G17, 0.025 U de Enzima Taq ADN Polimerasa High Fidelity y 2.5 μ L de reacción de la primera ronda. Los tubos fueron finalmente almacenados a -20°C.

Tabla 2. Condiciones de ciclado para la amplificación del gen *gag* del VIH-1.

Rondas de PCR	Van der Auwera & Heyndrick, 2000			Protocolo 1			Protocolo 2		
PRIMERA	48°C	45'	RT	45°C	30'	RT	45°C	30'	RT
	94°C	2'		94°C	2'		94°C	2'	
	94°C	30''	40 ciclos	94°C	30''	35 ciclos	94°C	30''	35 ciclos
	50°C	30''		50°C	30''		50°C	30''	
	68°C	1'30''		72°C	1'30''		72°C	2'	
	68°C	7'		72°C	7'		72°C	7'	
	4°C	∞		4°C	∞		4°C	∞	
SEGUNDA							94°C	2'	
				94°C	1'	3 ciclos	94°C	1'	3 ciclos
				50°C	1'		45°C	1'	
	94°C	2'		72°C	1'		72°C	1'	
	94°C	30''	35 ciclos	94°C	30''	32 ciclos	94°C	30''	32 ciclos
	50°C	30''		50°C	30''		45°C	1'	
	72°C	1'		72°C	1'30''		72°C	2'	
	72°C	7'		72°C	7'		72°C	7'	
	4°C	∞		4°C	∞		4°C	∞	

2.2) Amplificación de las regiones de la proteasa y transcriptasa reversa (*prt* y *rt*) del gen *pol*. Metodología desarrollada en el Hospital de Stanford (HIV, genotyping manual, 2008) en EE.UU.

Estas regiones fueron estudiadas para la identificación de las mutaciones puntuales que confieren resistencia a los antirretrovirales en el VIH-1. Consistió en la amplificación de un fragmento de 1700 pb mediante un ensayo de PCR (Primera ronda) y una Nested PCR para un fragmento de 1200 pb aproximadamente (Segunda ronda).

- **Primera ronda:** consistió en la mezcla de las concentraciones finales, las que se describen a continuación: *Buffer* de reacción 1X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3), 1.5 mM de MgCl₂, 0.8 mM de mezcla de dNTPs (200 µM de dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 0.5 pmol de *primer* RT-21, 0.5 pmol de *primer* 1243, 1 pmol de *primer* MAW-26 y 1.25 U de enzima Taq Polimerasa High Fidelity. Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo de denaturación inicial de 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 20 segundos, 72°C por 2 minutos y 1 ciclo de extensión final de 72°C por 10 minutos.
- **Segunda ronda:** se mezclaron las concentraciones finales de los siguientes reactivos: Buffer de reacción 1X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3), 1.5 mM de MgCl₂, 0.8 mM de mezcla de dNTPs (200 µM de ATP, dGTP, dCTP y dTTP), 0.2 pmol de *primer* PRO-1, 0.1 pmoles de RT-20 y 0.1 pmoles de *primer* 1205, y 1.25 U de enzima Taq Polimerasa High Fidelity. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de denaturación inicial por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 63°C por 20 segundos y 72°C por 2 minutos, una extensión final de 72°C por 10 minutos y finalmente una temperatura de almacenaje de 4°C.

2.3) Control de calidad del ADN extraído. Se siguió el método de PCR ADN proviral para el diagnóstico del VIH-1 – INS, 2016.

Los ADN aislados se sometieron a un control de calidad con la amplificación del gen de la β -globina (presente en el genoma humano). Se realizó la mezcla de PCR con las concentraciones finales de los siguientes reactivos: *Buffer* de reacción 1X (10 mM Tris-HCl, 50 Mm KCl, pH 8.3), 2 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTP, 0.1 pmol de los *primers* β 3 y β 4 (Tabla 3), y 0.02 U de enzima Taq Polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de denaturación inicial de 95°C por 7 minutos, 60 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto, 72°C por 7 minutos y 1 ciclo de extensión final de 72°C por 7 minutos.

Tabla 3. Primers utilizados para la amplificación del gen de la β -globina.

Gen amplificado	Nombre del primer	Secuencia	Tamaño en pb
β -globina	β 3	5'-CGG CTG TCA TCA CTT AGA CCT C-3'	250 pb
	β 4	5'-CTT CAT CCA CGT TCA CTT TGC-3'	

3) Electroforesis de ADN. Se siguió la metodología de Genotipificación del VIH – INS, 2017 y el manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN – INS, 2003.

Para la verificación de los productos de amplificación de los genes *gag* y *pol*, se utilizaron geles de agarosa de la marca BIORAD al 1.5%, cámara electroforética horizontal modelo CLEAVER y una fuente de poder PAC300. Se usaron dos marcadores de peso molecular: 100pb ladder y 200pb ladder, para el gen *gag* (fragmento de 460pb) y *pol* (fragmento de 1200pb), respectivamente. Para la visualización de los fragmentos de ADN se realizó una mezcla del producto de amplificación con un fluróforo Run safe, el que se adhiere al material genético, seguidamente, se sumergió el gel bajo un sistema de *Buffer* de electroforesis TAE 1X (40 mM de Tris acetato y 1 mM de EDTA) a 100V por 50 min.

Finalmente, se colocó el gel en el documentador de imágenes CHEMIDOCK XRS, el que dispone de luz UV y está conectado a una computadora para la revelación de las fotografías utilizando el software QuantityOne,

4) Purificación de productos de PCR. Técnica descrita en el método de Genotipificación del VIH - INS, 2017.

El proceso se llevó a cabo utilizando el kit comercial PureLink[®] Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen) para la purificación de los productos de PCR siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Para tal caso, se añadió 20 µL de producto amplificado con 4 volúmenes de *Buffer* de unión (B2), se transfirió la mezcla a una columna con colector. Se centrifugó a 12000 gravedades por 1 minuto con la finalidad de que el ADN quede retenido en la matriz de resina, seguidamente se descartó el colector junto con la solución libre de ADN y la columna se insertó en un nuevo colector. Se realizó el lavado añadiéndose 650 µL de *Buffer* de lavado (W1), se centrifugó a 12000 gravedades por 1 minuto y se continuó con el proceso de descarte del flujo con el colector, posteriormente se realizó una centrifugación durante 2 minutos a la máxima velocidad. Se colocó la columna en un tubo de 1.7 mL y se añadió 50 µL de *Buffer* de elusión (E1) para la recuperación del ADN de la columna. Por último, se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifugó a la máxima velocidad por el mismo tiempo. El purificado obtenido se usó directamente para el proceso de secuenciamiento de ADN.

A.2. Identificación de los subtipos del VIH-1. También descrito en el método de Genotipificación del VIH – INS, 2017.

1) Secuenciamiento de ADN

Se recurrió al método de Sanger para la determinación de las secuencias de los genes *gag* y *pol*, utilizando el equipo analizador genético ABI 3500 y el kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Se realizó una mezcla con un volumen final de reacción de 9 µL conteniendo: 0.3 µL de BigDye, 1.5 µL de

Buffer de secuenciamiento 5X, 5.9 µL de H₂O grado molecular, 1.3 µL de *primers* (2.5 pmol) y 1 µL de ADN. Se dieron las siguientes condiciones a la reacción de secuenciamiento: 96°C por 1 minuto, 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos y 60°C por 4 minutos. Posteriormente se añadieron 80 µL de solución de precipitación fría “Clean Up” a cada pocillo de la placa (Anexo 3), se incubó la mezcla a temperatura ambiente (20 – 25°C) durante 30 minutos y luego se centrifugó a 2000 gravedades por 30 minutos. Seguidamente, se realizaron los lavados con etanol al 70% y se centrifugó de igual forma a 2000 gravedades por 30 minutos. Luego se dejó secar la placa a temperatura ambiente por 10 minutos. Para la denaturación de los productos de secuenciamiento se agregó 15 µL de formamida pura a 95°C por 2 minutos. Finalizado el proceso de denaturación se colocó la placa en el analizador genético ABI 3500 XL.

2) Programas para el análisis del ADN: Metodología descrita por Yabar, 2017.

2.1) Construcción y alineamiento de secuencias consenso para ambos genes.

Se utilizó el programa SeqScape v2.7 para el análisis y ensamblaje de las secuencias, la observación de los electroferogramas y con ello los cambios nucleotídicos o mutaciones, y la calidad de las secuencias (ruidos); además permitió la exportación de los consensos en formato FASTA el cual sirvió para los análisis posteriores. Para el alineamiento de las secuencias se utilizó el programa MEGA v10.1, el que permitió importar las secuencias de ambos genes (FASTAS) y de ambos tiempos de toma de muestra, para el alineamiento respectivo.

2.2) Selección del modelo de sustitución nucleotídica.

Para la selección del mejor modelo de sustitución nucleotídica para cada gen (*gag* y *pol*) se recurrió al software JModelTest v2.1.10 en el que se importaron

las secuencias consenso (FASTAS) de ambos tiempos por cada gen. Este programa tiene en cuenta los tres criterios estadísticos para la elección del mejor modelo: Akaike Information Criterion (AIC), Bayesian Information Criterion (BIC) y Decision Theory Performance – Based Selection (DT). Se utilizaron los datos mostrados por los criterios AIC, el cual reveló al modelo General Time Reversible (GTR+G) como el más apropiado para el análisis de ambos genes.

2.3) Identificación de los subtipos de VIH-1 por filogenia.

Se utilizó el programa MEGA v10.1 para la realización de los árboles filogenéticos por el método de Máxima Verosimilitud (ML), mejor método reportado por Yabar, 2017 para el análisis de las muestras del VIH-1 con 500 réplicas de bootstrap, incorporándose además los subtipos de referencia con la finalidad de robustecer el árbol filogenético. Además, se realizó la concatenación de ambos marcadores (*gag-pol*), donde se consideró el emparejamiento del tamaño, nombre y marco de lectura de cada marcador genético, para ello se usó el programa BioEdit v7.2.5. Una vez obtenida la concatenación y el alineamiento, se realizó la construcción del árbol filogenético con el programa MEGA v10.1.

B. Determinación de la diversidad genética en los genes *gag* y *pol* y la recombinación genética del VIH-1: Se siguió el método reportado por Yabar, 2017.

1) Análisis de la diversidad genética en los genes *gag* y *pol* del VIH-1.

Para la realización de este análisis se utilizó el programa MEGA v10.1, para la determinación de la diversidad genética mediante el test D de Tajima (Tajima, 1989), el que permitió identificar: la diversidad genética a nivel de nucleótido (Π), el número de tasas entre los cambios no sinónimos y sinónimos (dN/dS), el número de tasa entre el total de transversiones y transiciones, y por último el estadístico D de Tajima para reconocer si las muestras en cuestión se encuentran en equilibrio

neutral de evolución dependiendo del valor de su signo positivo o negativo. Así mismo, se realizó la concatenación de los genes *gag-pol*, con el programa BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999) con la finalidad de determinar de la diversidad genética entre el primer y segundo tiempo.

2) Análisis de la recombinación genética del VIH-1.

Para este análisis se utilizaron 4 plataformas website: COMET HIV-1 v2.2 (Context-based Modeling for Expeditious Typing, disponible en: <https://comet.liv.lu/index.php?cat=hiv1>), REGA HIV-1 v3.0 (Herramienta para la detección de recombinaciones del VIH-1 de la Universidad de Stanford, disponible en: <http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/job/464801841/sequence-53>), jpHMM HIV-1 (jumping profile Hidden Markov Model, disponible en: http://jphmm.gobics.de/submission_hiv), y RIP v3.0 (Recombinant Identification Program, disponible en: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/RIP/RIP.html>), con el objetivo de obtener una mayor sensibilidad de los eventos recombinantes en ambos marcadores (*gag* y *pol*) del VIH-1. Todos los programas utilizados aceptaron los consensos (FASTAS).

C. Identificación de mutaciones de resistencia a los antirretrovirales. Descrita en el método de Genotipificación del VIH – INS, 2017.

Para la identificación de las mutaciones de resistencia a los antirretrovirales se utilizó la website HIV Drug Resistance Database v8.9-1 de la Universidad de Stanford (<https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-mutations/>), donde se seleccionaron a todos los ARVs para determinar su resistencia o susceptibilidad frente a las cepas de VIH-1 de cada participante en ambos tiempos del gen *pol*. Este programa mostró los sitios donde hubo un cambio de aminoácidos o una mutación que confiera resistencia a los ARVs. En el Anexo 4 se muestran los códigos de aminoácidos.

D. Determinación del perfil epidemiológico y el estado clínico de la población militar.

Los datos epidemiológicos de la población militar fueron almacenados en una base de datos epidemiológica en el programa Excel, teniendo en cuenta los principales factores de riesgo asociados con la transmisibilidad del VIH-1. Así mismo, los datos del recuento de CD4 (células/mL) y carga viral (Log10) del VIH-1 se obtuvieron a partir de las historias clínicas de cada participante.

3.2.5. Análisis estadístico.

A) Análisis de evolución molecular del VIH-1.

Los análisis evolutivos para la prueba de tasa relativa de Tajima se realizaron en MEGA v10.1, donde se determinó la igualdad de la tasa evolutiva entre las secuencias del primer y segundo tiempo de los marcadores seleccionados con una secuencia como grupo externo (cepa control HXB2), además los sitios idénticos entre las secuencias, el chi cuadrado (X^2) y el valor P, el cual indica que si es menor a 0.05 se usa para rechazar la hipótesis nula de tasas iguales entre linajes.

B) Análisis de varianza (ANOVA) para la resistencia a los ARVs en ambos intervalos de tiempo.

Se realizaron bases de datos de la resistencia a los ARVs, para luego realizar el análisis estadístico en el programa SPSS, los datos recolectados fueron almacenados en el programa Excel.

C) Descripción de frecuencias de variables intervinientes (epidemiológicas) y moleculares (% de subtipo B y no B).

Se creó una base de datos con el perfil epidemiológico de los participantes reclutados, donde se consignó la edad, sexo, preferencia sexual, consumo de drogas, contacto sexual con Trabajadores sexuales, uso del preservativo, otras ITS, recuento linfocitario de CD4, carga viral y los subtipos B y no B del VIH-1, datos que fueron tomados para el cálculo de frecuencias y porcentajes.

4. Resultados

4.1. Identificación de los subtipos y formas recombinantes del VIH-1.

A) Amplificación de los genes *gag* y *pol* del VIH-1.

Se procesaron un total de 104 muestras de sangre (ambos tiempos), de los que se obtuvieron diferentes niveles de sensibilidad, según el fragmento amplificado y el tiempo en que se tomó la muestra. En tanto que, en el primer tiempo la sensibilidad estuvo igualada en ambos genes con la misma cantidad de muestras amplificadas (49/52), mientras que, en el segundo tiempo, la mayor sensibilidad la obtuvo el gen *pol* con un total de 50/52 muestras amplificadas, revelando un porcentaje de sensibilidad del 94,2% (Tabla 4). Para las muestras que no amplificaron, se les volvió a extraer el material genético y a realizar los mismos procesos, obteniéndose el mismo resultado, por lo que se les denominó como “Indeterminado”.

Por lo tanto, al unificar los resultados de amplificación, se seleccionaron las muestras que sólo amplificaron para ambos genes y por ambos tiempos, haciendo un total de 46/52 muestras. De igual manera, para la determinación de la calidad del ADN, se logró amplificar el gen de la β -globina en un 100%.

Tabla 4. Sensibilidad de la PCR de los productos amplificados de los genes *gag* y *pol* del VIH-1 de los militares peruanos.

	Primer tiempo		Segundo tiempo	
	<i>Pol</i>	<i>Gag</i>	<i>Pol</i>	<i>Gag</i>
Productos amplificados	49/52	49/52	50/52	49/52
Porcentaje (%)	94,2%	94,2%	96,2%	94,2%

La electroforesis evidenció los productos de los genes *gag*, *pol* y de la β -globina, productos de 460 pb, 1200 pb y 250 pb (Figura 2).

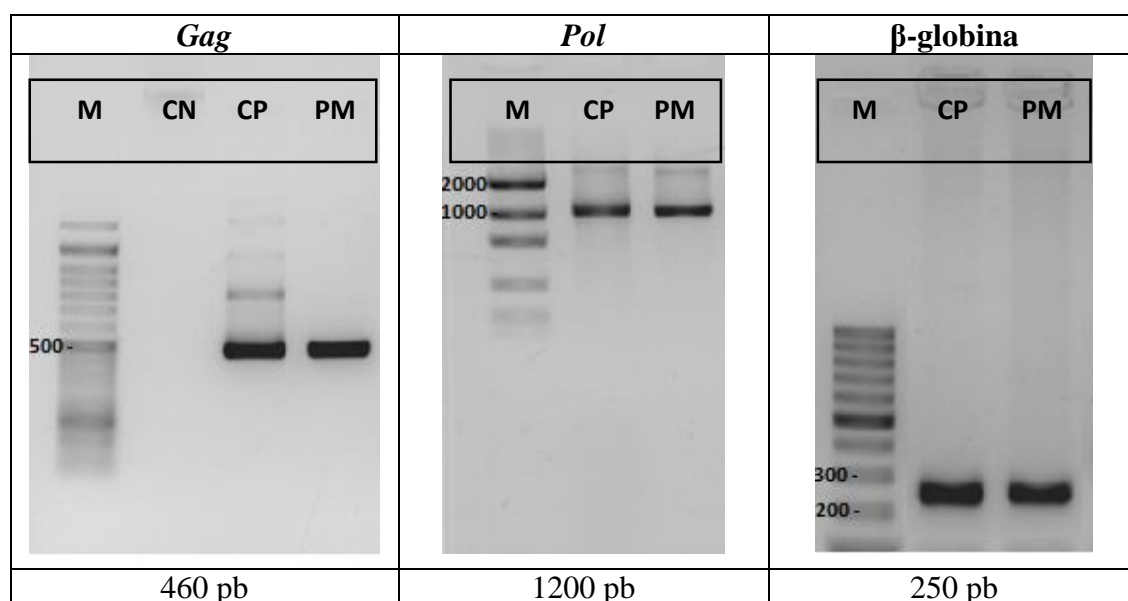


Figura 2. Amplificación de los productos de la PCR de los genes *gag*, *pol* y β -globina. M = Marcador de peso molecular. Para *gag* y β -globina (100 pb Ladder) y para *pol* (200 pb Ladder). CN = Control negativo; CP = Control positivo; PM = población militar (Muestra)

B) Identificación de los subtipos del VIH-1.

Los árboles filogenéticos mostrados en las Figuras 3 y 4, y en Anexos 5 (A, B y C), 6 (A, B y C) y 7 (A, B y C) evidencian el emparejamiento “match” de las muestras de los militares tanto de su primera como de su segunda toma de muestra en diferentes tiempos, además se demuestra la formación de un clado de estas muestras con el subtipo B de referencia con valores bootstrap >75%, mientras que formando otro clado, se encuentran los otros subtipos (no B), no obstante, se observa que el subtipo D, guarda una estrecha relación filogenética con el subtipo B y por ende con las muestras de los militares.

Por otro lado, la muestra PM62 fue la única que mostró diferente emparejamiento con otros subtipos no B, dependiendo del gen analizado; para el caso del gen *pol*, el emparejamiento se dio con el subtipo G (Figura 3A), mientras que para el gen *gag* se alineó filogenéticamente con el subtipo A (Figura 3B). De igual manera, se realizó la construcción de los árboles filogenéticos con los genes concatenados (Figura 4), lo que permitió determinar al subtipo B, como el más prevalente en esta población con el 97.8%.

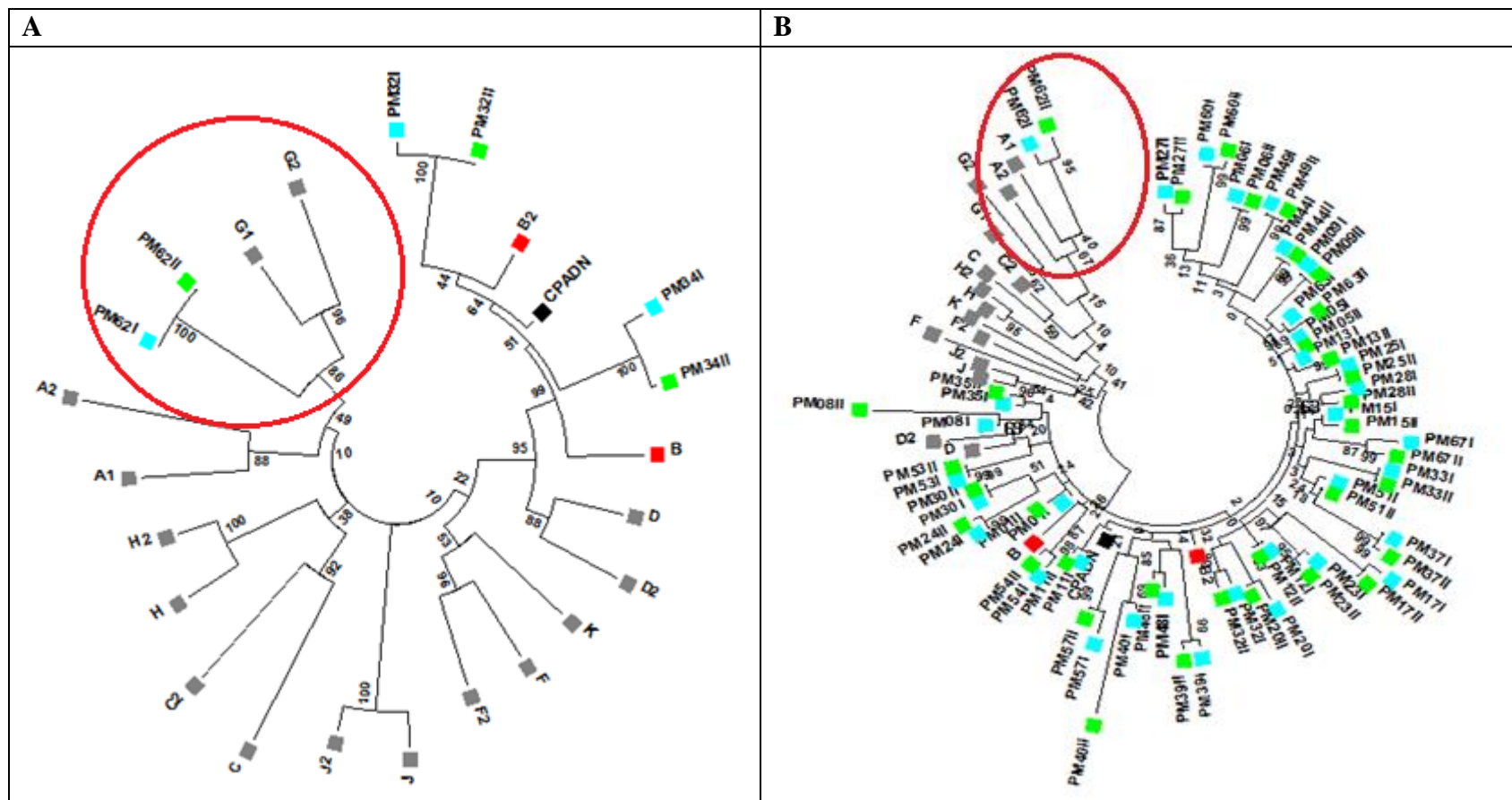


Figura 3. **A)** Árbol filogenético del gen *pol* del VIH-1 en la población militar (ambos tiempos). **B)** Árbol filogenético del gen *gag* del VIH-1 en la población militar (ambos tiempos). Método de Máxima Verosimilitud con 500 réplicas. Celeste = Primer tiempo – población militar; Verde = Segundo tiempo – población militar; Negro = Control Positivo ADN (cepa HXB2); Rojo = Subtipos B; Gris = Subtipos no B.

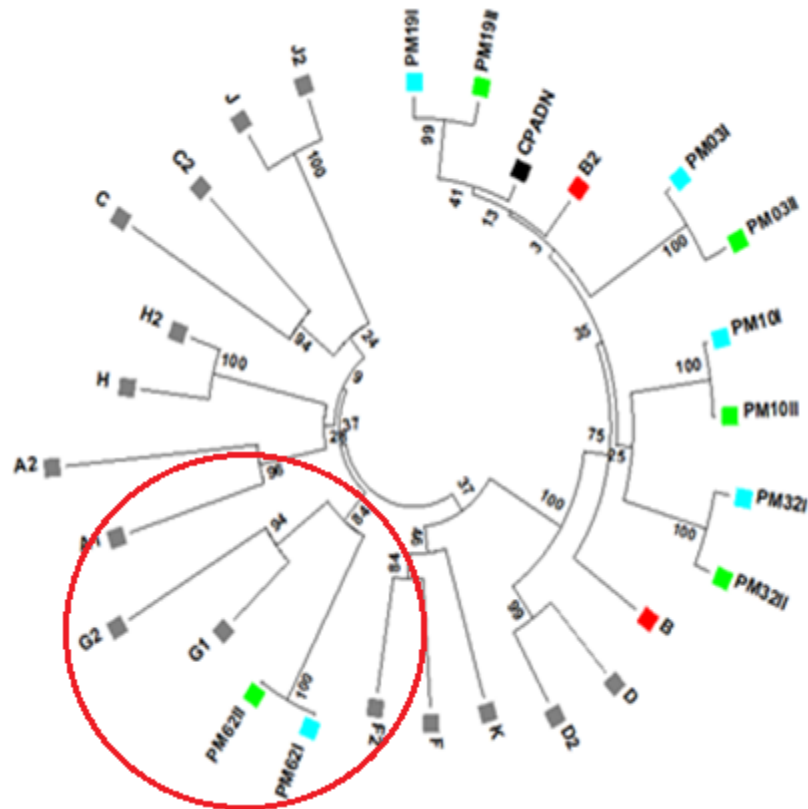


Figura 4. Árbol filogenético de los genes concatenados *gag-pol* del VIH-1 en la población militar (ambos tiempos). Método de Máxima Verosimilitud con 500 réplicas. Celeste = Primer tiempo – población militar; Verde = Segundo tiempo – población militar; Negro = Control Positivo ADN (cepa HXB2); Rojo = Subtipos B; Gris = Subtipos no B.

4.2. Determinación de la diversidad genética en los genes *gag* y *pol*, y recombinación genética del VIH-1.

4.2.1. Análisis de la diversidad genética en los genes *gag* y *pol* del VIH-1 en ambos tiempos.

El análisis incluyó 46 secuencias de nucleótidos por cada gen propuesto (Anexos 8 y 9), donde se logró determinar la diversidad intragenética, intergenética así como la diversidad genética entre ambos tiempos de toma de muestra mediante la concatenación de los genes (*gag-pol*).

En la tabla 5, se muestra al gen *pol* del primer tiempo con la mayor cantidad de sitios segregantes (150), pero con la menor cantidad de diversidad a nivel de nucleótidos 0.025665, frente al segundo tiempo con 102 sitios segregantes y un valor $\pi = 0.033819$ de diversidad a nivel de nucleótidos. Por otro lado, se evidenció un aumento en la tasa entre cambios no sinónimos y sinónimos (dN/dS) de 0.216450 a 0.313846; de la misma manera para la tasa entre transiciones y transversiones de 0.049250 a 0.071411. Así mismo, se determinó al gen *gag* del primer tiempo, con la menor cantidad de sitios segregantes (78), donde también se evidenció un aumento en el segundo tiempo en la diversidad a nivel de nucleótidos, la tasa entre cambios no sinónimos y sinónimos, y la tasa entre transiciones y transversiones.

Con relación al estadístico D de Tajima, ambos genes tanto en el primer como en el segundo tiempo presentaron valores negativos, no obstante, el mayor valor negativo lo obtuvo el gen *gag* del segundo tiempo con -1.308912 frente al primer tiempo con -1.538703, por el contrario, para el gen *pol* el mayor valor negativo se dio en el primer tiempo con -1.737798, mientras que en el segundo tiempo se obtuvo -1.892446.

Tabla 5. Análisis de la diversidad genética mediante el Test D de Tajima de los marcadores *gag* y *pol* del VIH-1 en ambos tiempos.

Tiempo	Gen	m	S	π	dN/dS	Transc/Transv	D
Primer tiempo	<i>Gag</i>	46	78	0.049191	0.380488	0.086574	-1.538703
	<i>Pol</i>	46	150	0.025665	0.216450	0.049250	-1.737798
Segundo tiempo	<i>Gag</i>	46	102	0.065015	0.449339	0.102240	-1.308912
	<i>Pol</i>	46	102	0.033819	0.313846	0.071411	-1.892446

Abreviaturas: m = número de secuencias, S = número de sitios segregantes, dN/dS = tasa entre cambios no sinónimos (dN) y sinónimos (dS), Transc/Transv = Tasa entre transiciones y transversiones, π (pi) = diversidad a nivel de nucleótidos, D = estadístico de prueba de Tajima. (Tajima. 1989).

De igual forma, se realizó el Test D de Tajima para determinar la diversidad genética entre ambos tiempos, por lo que se realizó la concatenación de ambos genes, mostrándose los resultados en la Tabla 6, donde se evidencia un aumento en el segundo tiempo en la diversidad genética de 0.0308333 a 0.045609, así también, un aumento en la tasa entre cambios no sinónimos y sinónimos (dN/dS), y la tasa entre transiciones y transversiones (Transc/Transv), sin embargo, la mayor cantidad de sitios segregantes se presentó en el primer tiempo con 226, mientras que para el estadístico D de Tajima, como era de esperarse los valores obtenidos fueron negativos, presentándose el mayor de ellos en el segundo tiempo con -1.650451.

Tabla 6. Análisis de la diversidad genética mediante el Test D de Tajima de los marcadores concatenados *gag-pol* del VIH-1 en ambos tiempos.

Tiempo	Concatenación de marcadores	m	S	π	dN/dS	Transc/Transv	D
Primer tiempo	<i>Gag-pol</i>	46	226	0.030833	0.252232	0.057391	-1.690728
Segundo tiempo	<i>Gag-pol</i>	46	201	0.045609	0.366120	0.083305	-1.650451

Abreviaturas: m = número de secuencias, S = número de sitios segregantes, dN/dS = tasa entre cambios no sinónimos (dN) y sinónimos (dS), Transc/Transv = Tasa entre transiciones y transversiones, π (pi) = diversidad a nivel de nucleótidos, D = estadístico de prueba de Tajima. (Tajima. 1989).

4.2.2. Análisis de la recombinación genética en los genes *gag* y *pol* del VIH-1 en ambos tiempos.

Se identificaron los eventos de recombinantes (Tabla 7), presentando el gen *gag* un mayor índice de recombinación con el 10.9% (primer tiempo) y el 8.7% (segundo tiempo). A su vez, el tipo de recombinación B/F1 se encontró con más frecuencia, pero sólo en el gen *gag*, seguida del tipo B/D (en ambos genes, pero del segundo tiempo) y la CRF02_AG presente en ambos genes y tiempos. Además, se determinó la sensibilidad de las plataformas utilizadas para la recombinación genética, tanto en el gen *gag* como en el *pol*, teniendo una mayor sensibilidad la plataforma COMET HIV-1 v2.2 para ambos genes y ambos tiempos con el 100%, además para el gen *gag* se presentaron mayores problemas con la identificación de algunas secuencias, no reconociéndolas y, por lo tanto, disminuyendo su sensibilidad hasta 82.6% para la plataforma REGA v3.0 (Anexo 10). Los eventos de recombinación genética se muestran en las figuras del Anexo 11 (A, B, C, D, E, F, G y H).

Tabla 7. Eventos de recombinación genética en los genes *gag* y *pol* del VIH-1 en ambos tiempos.

Gen	Número de eventos de recombinación	Porcentaje (%)	Tipo de recombinación
Primer tiempo			
<i>Pol</i>	1	2.2	CRF02_AG
<i>Gag</i>	5	10.9	B/F1 (4), CRF02_AG (1)
Segundo tiempo			
<i>Pol</i>	3	6.5	B/D (2), CRF02_AG (1)
<i>Gag</i>	4	8.7	B/F1 (2), CRF02_AG (1), B/D (1)

4.3. Identificación de mutaciones de resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales.

4.3.1. Identificación de mutaciones de resistencia del VIH-1 a los grupos de inhibidores en ambos tiempos.

Se identificaron las mutaciones de resistencia por grupos de ARVs teniendo en cuenta los dos tiempos de toma de muestra. Por lo tanto, para los Inhibidores de la Proteasa (IP) en el primer tiempo se observó, que entre las principales mutaciones destacó la

L90M con un 4.3%, mientras que en las mutaciones secundarias la frecuencia fue mayor de dos mutaciones: L10I (19.6%) y A71V (15.2%); para el segundo tiempo las principales mutaciones fueron: D30N (6.5%) y L90M (4.3%), mientras que la frecuencia de las mutaciones secundarias estarían dadas por: N88D (6.5%), A71V y K20T ambas con el 4.3% (Tablas 8 y 9).

De otro lado, se muestran a los Inhibidores no nucleósidos de la Transcriptasa reversa (INNTR) donde destacó la mutación de resistencia K103KN con un 6.5% en el primer tiempo y para el segundo tiempo se identificaron dos mutaciones de resistencia: P225PH y K103N ambas con el 4.3% (Tabla 10). Finalmente, en los Inhibidores nucleósidos de la Transcriptasa reversa (INTR), se identificaron en el primer tiempo las mutaciones: L210LW y M184V, cada una de ellas con el 8.7%, mientras que en el segundo tiempo se volvió a identificar la mutación M184V con el mismo porcentaje y la mutación D67N con el 6.5% (Tablas 11 y 12).

A su vez, se identificaron a las mutaciones M46IM, I54V, V82AV, L90LM que le confieren resistencia a la mayoría de los IP, con excepción del Darunavir + Ritonavir (DRV/r), sin embargo, cuando se presentó sólo la mutación L90M, le confería resistencia al DVR/r, y al Tipranavir + Ritonavir (TPV/r), mientras que la mutación N88S y D30N sólo le conferían resistencia al TPV/r y Nelfinavir (NFV), respectivamente. En cuanto a las mutaciones K101KE, Y181C, G190S, L100LI, mostraron resistencia a todos los INNTR, mientras que por sí sola la mutación Y188YFHL, también le confirió resistencia a todos los INNTR, lo que, a su vez, la mutación K103KN sólo le confería resistencia al Efavirenz (EFV) y Nevirapina (NVP). Por último, se identificaron a las mutaciones M41LM, M184MV y L210LW que confieren resistencia a todos los INTR, mientras que la mutación M184V sólo le confería alto nivel de resistencia a la Lamivudina (3TC) y Emtricitabina (FTC).

Tabla 8. Frecuencia de mutaciones de resistencia del VIH-1 a los Inhibidores de la Proteasa en el primer tiempo.

Toma de muestra	Tipo de mutación	Frecuencia	Porcentaje (%)
PRIMER TIEMPO	L90M	2	4.3
	D30DN	1	2.2
	M46KLMQ	1	2.2
	M46IM	1	2.2
	I54IV	1	2.2
	V82AV	1	2.2
	L90LM	1	2.2
	D30N	1	2.2
	I54V	1	2.2
	V82IL	1	2.2
	L10I	9	19.6
	A71V	7	15.2
	A71T	2	4.3
	A71AV	2	4.3
	K20IM	1	2.2
	A71AT	1	2.2
	N88DN	1	2.2
	K20KT	1	2.2
	K43KT	1	2.2
	L10V	1	2.2
	G73GS	1	2.2
	V11AITV	1	2.2
	N88D	1	2.2
	K20T	1	2.2
	V11I	1	2.2

Tabla 9. Frecuencia de mutaciones de resistencia del VIH-1 a Inhibidores de la Proteasa en el segundo tiempo.

Toma de muestra	Tipo de mutación	Frecuencia	Porcentaje (%)
SEGUNDO TIEMPO	D30N	3	6.5
	L90M	2	4.3
	I54IL	1	2.2
	N88S	1	2.2
	L90LM	1	2.2
	M46I	1	2.2
	I54V	1	2.2
	N88D	3	6.5
	K20T	2	4.3
	A71V	2	4.3
	K43T	1	2.2
	A71T	1	2.2
	Q58E	1	2.2
	A71AV	1	2.2
	T74TP	1	2.2
	L10I	1	2.2
	V11I	1	2.2
	G73S	1	2.2

Tabla 10. Frecuencia de mutaciones de resistencia del VIH-1 a los Inhibidores no Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa en ambos tiempos.

Toma de muestra	Tipo de mutación	Frecuencia	Porcentaje (%)
PRIMER TIEMPO	K103KN	3	6.5
	V108IMV	1	2.2
	V179DEV	1	2.2
	V106I	1	2.2
	Y188FHL Y	1	2.2
	V90I	1	2.2
	V179D	1	2.2
	V108VI	1	2.2
	V179VD	1	2.2
	Y188YFHL	1	2.2
	K103N	1	2.2
	K101KE	1	2.2
	Y181C	1	2.2
	G190S	1	2.2
	L100LI	1	2.2
SEGUNDO TIEMPO	P225PH	2	4.3
	K103N	2	4.3
	K103KN	1	2.2
	M230I	1	2.2
	K101EK	1	2.2
	Y181CY	1	2.2
	G190GRS	1	2.2
	V179E	1	2.2
	Y188YFHL	1	2.2
	V90I	1	2.2
	V179D	1	2.2
	K238KT	1	2.2
	K101KE	1	2.2
	Y181C	1	2.2
	G190S	1	2.2
	H221Y	1	2.2

Tabla 11. Frecuencia de mutaciones de resistencia del VIH-1 a los Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa en el primer tiempo.

Toma de muestra	Tipo de mutación	Frecuencia	Porcentaje (%)
PRIMER TIEMPO	L210LW	4	8.7
	M184V	4	8.7
	M41LM	3	6.5
	M184MV	3	6.5
	K70R	2	4.3
	K219Q	2	4.3
	M41ML	2	4.3
	T215NSTY	2	4.3
	D67DN	2	4.3
	K70KR	2	4.3
	L74IL	2	4.3
	D67N	2	4.3
	L210LRW	1	2.2
	T69NT	1	2.2
	T215SY	1	2.2
	K219KQ	1	2.2
	M184IMV	1	2.2
	A62V	1	2.2
	T215IT	1	2.2
	V75VIM	1	2.2
	F77FL	1	2.2
	T215TFIS	1	2.2
	A62AV	1	2.2
	K65KR	1	2.2
	V75IM	1	2.2
	K219KE	1	2.2
	L74LFV	1	2.2
	V75VAIT	1	2.2
	Y115YF	1	2.2
	T215TNSY	1	2.2

Tabla 12. Frecuencia de mutaciones de resistencia del VIH-1 a los Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa en el segundo tiempo.

Toma de muestra	Tipo de mutación	Frecuencia	Porcentaje (%)
SEGUNDO TIEMPO	M184V	4	8.7
	D67N	3	6.5
	K70R	2	4.3
	T215TI	2	4.3
	K219Q	2	4.3
	K70KR	2	4.3
	M41L	2	4.3
	T215Y	2	4.3
	M184MV	2	4.3
	L210W	1	2.2
	L74IV	1	2.2
	M184MIV	1	2.2
	D67DN	1	2.2
	E40F	1	2.2
	M184I	1	2.2
	V75VIM	1	2.2
	F77FL	1	2.2
	A62V	1	2.2
	K65KR	1	2.2
	V75I	1	2.2

Se determinó también a los participantes con frecuencia de mutaciones de resistencia hacia los diferentes grupos de ARVs comparando el primer y segundo tiempo de tomas de muestra (Anexo 12 A, B y C), donde la mayor cantidad de mutaciones de resistencia fueron frente a los Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa reversa (INTR), seguida de los Inhibidores de la Proteasa (IP) y por último los Inhibidores no Nucleósidos de la Transcriptasa reversa (INNTR), observándose además, a 17 participantes con mutaciones de resistencia frente a los IP, 16 frente a los INNTR y 13 frente a los INTR.

4.3.2. Análisis de resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales en ambos tiempos.

Se realizó también el análisis donde se determinó el porcentaje de resistencia y sensibilidad para cada grupo de inhibidores del VIH-1 (Tablas 13 y 14), así se tiene que el mayor índice de resistencia está dado en los INTR en ambos tiempos, teniendo al Abacavir (ABC) como el antirretroviral con mayor índice de resistencia al VIH-1 en esta población, aumentando en el segundo tiempo del 21.7% al 23.9%, seguido de la Lamivudina (3TC) y Emtricitabina (FTC) con el 21.7% en ambos tiempos. Luego los INNTR, de los cuales la Nevirapina (NVP) presentó el mayor índice de resistencia con 17.4% disminuyendo para el segundo tiempo a 15.2%, mientras que el Efavirenz (EFV) se mantuvo en ambos tiempos con el 15.2%. Por último, los IP, los cuales la mayoría de los antirretrovirales aumentó la resistencia para el segundo tiempo, con excepción del Nelfinavir (NVR) que disminuyó de 13% hasta 8.7% y el Tipranavir + Ritonavir (TPV/r) que se mantuvo en 4.3%.

Tabla 13. Análisis de resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales durante el primer tiempo.

CLASES DE ANTIRRETROVIRALES	ALTO NIVEL DE RESISTENCIA	RESISTENCIA INTERMEDIA	BAJO NIVEL DE RESISTENCIA	SUSCEPTIBLE	% RESISTENCIA	% SENSIBILIDAD
INHIBIDORES DE LA PROTEASA					6.3	89.7
ATAZANAVIR + RITONAVIR (ATV/r)	2	0	1	43	6.5	93.5
DARUNAVIR + RITONAVIR (DRV/r)	0	0	0	46	0.0	100.0
FOSAMPRENAVIR + RITONAVIR (FPV/r)	2	0	1	43	6.5	93.5
INDINAVIR + RITONAVIR (IDV/r)	2	1	0	43	6.5	93.5
LOPINAVIR + RITONAVIR (LPV/r)	1	1	1	43	6.5	93.5
NELFINAVIR (NFV)	5	0	1	25	13.0	54.3
SAQUINAVIR + RITONAVIR (SQV/r)	2	1	0	43	6.5	93.5
TIPRANAVIR + RITONAVIR (TPV/r)	1	1	0	44	4.3	95.7
INHIBIDORES NO NUCLEÓSIDOS DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA					12.5	87.5
EFAVIRENZ (EFV)	7	0	0	39	15.2	84.8
ETRAVIRINA (ETR)	1	1	2	42	8.7	91.3
NEVIRAPINA (NVP)	7	0	1	38	17.4	82.6
RILPIVIRINA (RPV)	4	0	0	42	8.7	91.3
INHIBIDORES NUCLEÓSIDOS DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA					19.6	80.4
LAMIVUDINA (3TC)	8	1	1	36	21.7	78.3
ABACAVIR (ABC)	6	2	2	36	21.7	78.3
ZIDOVUDINA (AZT)	6	1	1	38	17.4	82.6
ESTAVUDINA (d4T)	7	1	0	38	17.4	82.6
EMTRICITABINA (FTC)	8	1	1	36	21.7	78.3
DIDANOSINA (ddI)	7	1	1	37	19.6	80.4
TENOFOVIR (TDF)	6	1	1	38	17.4	82.6

Tabla 14. Análisis de resistencia del VIH-1 a los antirretrovirales durante el segundo tiempo.

CLASES DE ANTIRRETROVIRALES	ALTO NIVEL DE RESISTENCIA	RESISTENCIA INTERMEDIA	BAJO NIVEL DE RESISTENCIA	SUSCEPTIBLE	% RESISTENCIA	% SENSIBILIDAD
INHIBIDORES DE LA PROTEASA					8.2	88.3
ATAZANAVIR + RITONAVIR (ATV/r)	2	0	3	41	10.9	89.1
DARUNAVIR + RITONAVIR (DRV/r)	0	0	1	45	2.2	97.8
FOSAMPRENAVIR + RITONAVIR (FPV/r)	1	1	2	42	8.7	91.3
INDINAVIR + RITONAVIR (IDV/r)	1	2	1	42	8.7	91.3
LOPINAVIR + RITONAVIR (LPV/r)	0	1	3	42	8.7	91.3
NELFINAVIR (NFV)	3	0	1	29	8.7	63.0
SAQUINAVIR + RITONAVIR (SQV/r)	2	1	3	40	13.0	87.0
TIPRANAVIR + RITONAVIR (TPV/r)	0	1	1	44	4.3	95.7
INHIBIDORES NO NUCLEÓSIDOS DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA					11.4	88.6
EFAVIRENZ (EFV)	6	0	1	39	15.2	84.8
ETRAVIRINA (ETR)	2	0	1	43	6.5	93.5
NEVIRAPINA (NVP)	6	1	0	39	15.2	84.8
RILPIVIRINA (RPV)	3	1	0	42	8.7	91.3
INHIBIDORES NUCLEÓSIDOS DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA					18.0	82.0
LAMIVUDINA (3TC)	9	1	0	36	21.7	78.3
ABACAVIR (ABC)	3	2	6	35	23.9	76.1
ZIDOVUDINA (AZT)	3	2	2	39	15.2	84.8
ESTAVUDINA (d4T)	4	2	1	39	15.2	84.8
EMTRICITABINA (FTC)	9	1	0	36	21.7	78.3
DIDANOSINA (ddI)	2	4	1	39	15.2	84.8
TENOFOVIR (TDF)	2	0	4	40	13.0	87.0

4.4. Determinación del perfil epidemiológico y estado clínico de la población militar.

Los resultados revelaron al 100% de los participantes masculinos, siendo el mayor rango de edad los mayores a 50 años con el 50%, indicando a la heterosexualidad (86.5%) como la mayor preferencia sexual por los militares, los que respondieron al siempre uso del preservativo con un 67.3%. Además, se les cuestionó si tuvieron contacto sexual con trabajadores sexuales y si son consumidores de drogas ilegales a los que la mayoría respondió “NO” con un 82.7% y 96.2%, respectivamente, así mismo se les preguntó si tenían alguna ITS aparte del VIH respondiendo SI el 21.2% (Tabla 15).

Con respecto a los datos clínicos, se obtuvo el recuento de CD4 (células /mL) y carga viral (log 10) del VIH-1 de los participantes en ambos tiempos, presentando una mayor variación en la carga viral, disminuyendo para algunos casos y elevándose para otros, dependiendo el tiempo en que se tomó la muestra (Figura 5), teniendo el pico más elevado del primer tiempo con log 5.25 el que disminuyó hasta log 2.19 para el segundo tiempo, por el contrario, el pico más elevado del segundo tiempo con log 5.43 perteneció a un participante que para el primer tiempo se reportó con log 3.94, mientras que para otros se mantuvo su carga viral en niveles indetectables. A su vez, el recuento de CD4 mantuvo un rango normal para la mayoría de los participantes (500 - 1000 células/mL) a excepción de un participante que se contabilizó un total de 39 células/mL en el primer tiempo, mostrando un aumento a 271 células/mL para el segundo tiempo (Figura 6). Todos los datos del recuento linfocitario de CD4 y la carga viral del VIH-1, se encuentran en el Anexo 13.

Tabla 15. Perfil epidemiológico de militares peruanos de Lima y Callao infectados con VIH-1, 2015 - 2018.

Parámetros	Números de participantes	Porcentaje (%)
Edad:		
<30 años	3	5.8
30-39 años	7	13.5
40-50 años	16	30.8
>50	26	50.0
Género:		
Masculino	52	100.0
Femenino	0	0.0
Factores de riesgo:		
Preferencia sexual		
Heterosexual	45	86.5
Homosexual	1	1.9
Bisexual	3	5.8
No declaró	3	5.8
Contacto sexual con TS*		
SI	8	15.4
NO	43	82.7
No declaró	1	1.9
Consumo de drogas		
SI	1	1.9
NO	50	96.2
No declaró	1	1.9
Uso del preservativo		
Siempre	35	67.3
Periódicamente	7	13.5
Nunca	0	0.0
No declaró	10	19.2
ITS que no sea VIH		
SI	10	19.2
NO	29	55.8
No declaró	13	25.0

TS = Trabajadoras sexuales; ITS = Infección de transmisión sexual.

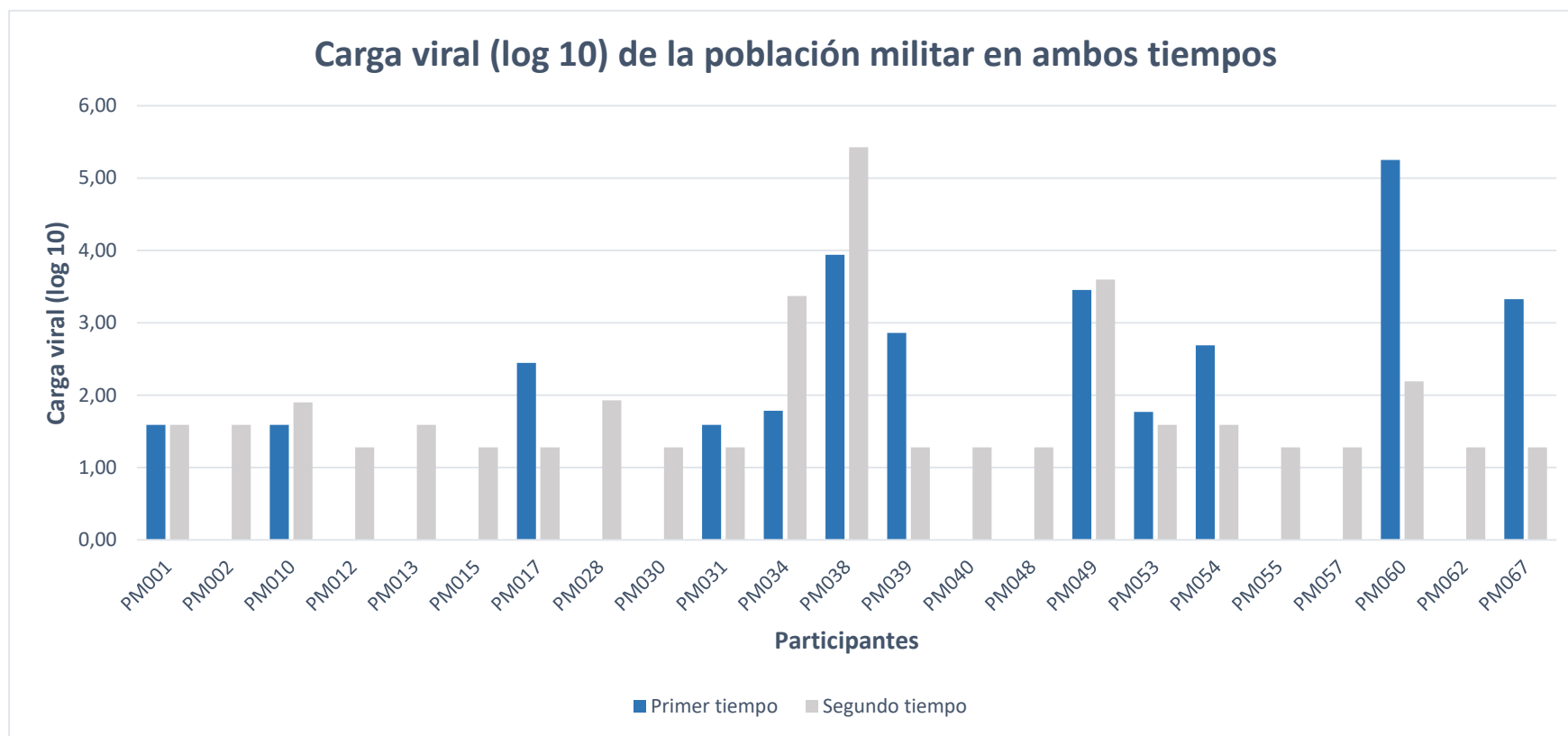


Figura 5. Carga viral (log 10) del VIH-1 de la población militar en ambos tiempos de toma de muestra.

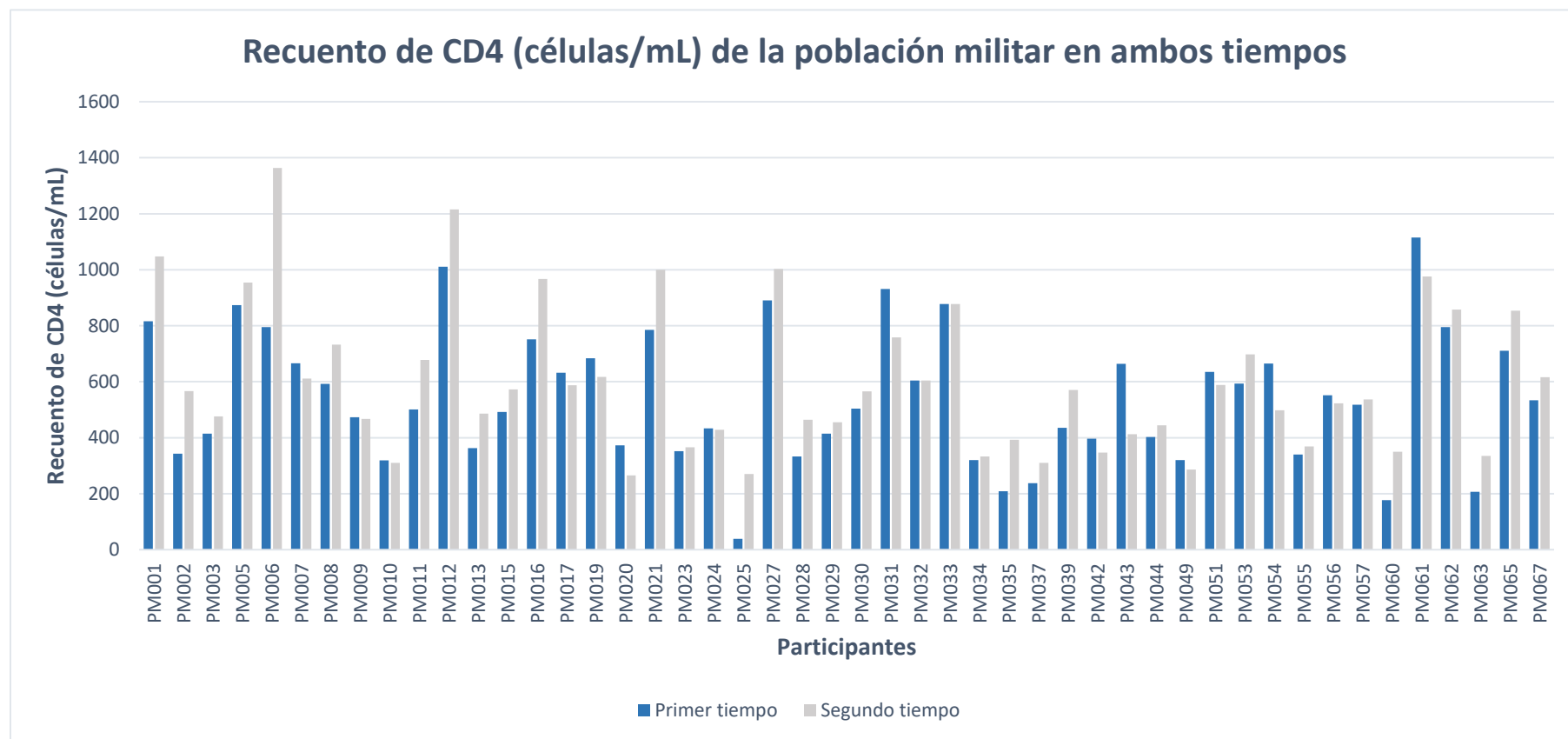


Figura 6. Recuento de CD4 (células/mL) de la población militar en ambos tiempos de toma de muestra.

4.5. Análisis estadístico

A) Análisis de evolución molecular del VIH-1.

Se analizó la igualdad de la tasa evolutiva entre las secuencias del primer y segundo tiempo de cada paciente, junto con la secuencia control utilizada como un grupo externo (cepa HXB2), para la prueba de tasa relativa de Tajima para cada marcador molecular (Tajima, 1993), donde se observó para el caso del gen *pol* a siete participantes, cuyo valor P fue estadísticamente significativo (<0.05), lo que demuestra un cambio significativo a nivel de nucleótidos entre ambos tiempos o evolución molecular, así tenemos por ejemplo al participante PM044, donde la secuencia consenso del primer tiempo, presenta tres nucleótidos propios, mientras que en el segundo tiempo presenta 23, por lo que su valor P fue 0.00009 (Anexo 14).

De igual manera, se analizó el gen *gag*, donde se encontró a seis participantes cuyo valor P también fue menor a 0.05 (Anexo 15), no coincidiendo con los mismos resultados del gen *pol*, a excepción del participante PM008, presentando un valor P de 0.02535 para *pol* y 0.01638 para *gag*.

B) Análisis de varianza (ANOVA) para la resistencia a los ARVs en ambos intervalos de tiempo.

Con la finalidad de corroborar la aparición de resistencia adquirida por consumo de los ARVs en ambos tiempos de toma de muestra, se realizó un ANOVA (Tablas 16, 17 y 18) de acuerdo a lo descrito en la metodología, obteniéndose una mayor asociación estadísticamente significativa en los INNTR (Tabla 18): Efavirenz – T1 ($p = 0.034$), Efavirenz – T2 ($p = 0.023$), Etravirina – T1 ($p = 0.028$), Nevirapina – T1 ($p = 0.042$) y Nevirapina – T2 ($p = 0.026$); mientras que para el caso de los INTR (Tabla 17), sólo la Zidovudina – T2 ($p = 0.037$) fue estadísticamente significativa.

Tabla 16. ANOVA de la aparición de la resistencia adquirida a los Inhibidores de la Proteasa en ambos tiempos.

INHIBIDORES DE LA PROTEASA						
Antirretrovirales		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P
Atazanavir + Ritonavir (ATV/r) - T1	Entre grupos	1.268	3	0.423	1.065	0.374
	Dentro de grupos	16.667	42	0.397		
	Total	17.935	45			
Atazanavir + Ritonavir (ATV/r) - T2	Entre grupos	2.096	3	0.699	1.712	0.179
	Dentro de grupos	17.143	42	0.408		
	Total	19.239	45			
Darunavir + Ritonavir (DVR/r) - T1	Entre grupos	0.000	3	0.000		
	Dentro de grupos	0.000	42	0.000		
	Total	0.000	45			
Darunavir + Ritonavir (DVR/r) – T2	Entre grupos	0.026	3	0.009	0.380	0.768
	Dentro de grupos	0.952	42	0.023		
	Total	0.978	45			
Fosamprenavir + Ritonavir (FPV/r) - T1	Entre grupos	1.268	3	0.423	1.065	0.374
	Dentro de grupos	16.667	42	0.397		
	Total	17.935	45			
Fosamprenavir + Ritonavir (FPV/r) – T2	Entre grupos	1.268	3	0.423	1.402	0.256
	Dentro de grupos	12.667	42	0.302		
	Total	13.935	45			
Indinavir + Ritonavir (IDV/r) - T1	Entre grupos	1.656	3	0.552	1.224	0.313
	Dentro de grupos	18.952	42	0.451		
	Total	20.609	45			
Indinavir + Ritonavir (IDV/r) – T2	Entre grupos	1.656	3	0.552	1.551	0.216
	Dentro de grupos	14.952	42	0.356		
	Total	16.609	45			
Lopinavir + Ritonavir (LPV/r) - T1	Entre grupos	0.932	3	0.311	1.062	0.376
	Dentro de grupos	12.286	42	0.293		
	Total	13.217	45			
Lopinavir + Ritonavir (LPV/r) – T2	Entre grupos	0.647	3	0.216	1.559	0.213
	Dentro de grupos	5.810	42	0.138		
	Total	6.457	45			
Nelfinavir (NFV) - T1	Entre grupos	8.312	3	2.771	2.209	0.101
	Dentro de grupos	52.667	42	1.254		
	Total	60.978	45			
Nelfinavir (NFV) – T2	Entre grupos	1.166	3	0.389	0.412	0.745
	Dentro de grupos	39.638	42	0.944		
	Total	40.804	45			
Saquinavir + Ritonavir (SQV/r) - T1	Entre grupos	1.656	3	0.552	1.224	0.313
	Dentro de grupos	18.952	42	0.451		
	Total	20.609	45			

Saquinavir + Ritonavir (SQV/r) – T2	Entre grupos	3.131	3	1.044	2.279	0.093
	Dentro de grupos	19.238	42	0.458		
	Total	22.370	45			
Tipranavir + Ritonavir (TPV/r) - T1	Entre grupos	0.647	3	0.216	0.767	0.519
	Dentro de grupos	11.810	42	0.281		
	Total	12.457	45			
Tipranavir + Ritonavir (TPV/r) – T2	Entre grupos	0.233	3	0.078	0.713	0.550
	Dentro de grupos	4.571	42	0.109		
	Total	4.804	45			

Tabla 17. ANOVA de la aparición de la resistencia adquirida a los Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa en ambos tiempos.

INHIBIDORES NUCLEÓSIDOS DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA						
Antirretrovirales		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P
Lamivudina (3TC) -T1	Entre grupos	9.133	3	3.044	2.458	0.076
	Dentro de grupos	52.019	42	1.239		
	Total	61.152	45			
Lamivudina (3TC) -T2	Entre grupos	6.451	3	2.150	1.499	0.229
	Dentro de grupos	60.267	42	1.435		
	Total	66.717	45			
Abacavir (ABC) - T1	Entre grupos	6.507	3	2.169	2.026	0.125
	Dentro de grupos	44.971	42	1.071		
	Total	51.478	45			
Abacavir (ABC) – T2	Entre grupos	4.752	3	1.584	2.343	0.087
	Dentro de grupos	28.400	42	0.676		
	Total	33.152	45			
Zidovudina (AZT / ZDV) - T1	Entre grupos	5.108	3	1.703	1.614	0.200
	Dentro de grupos	44.305	42	1.055		
	Total	49.413	45			
Zidovudina (AZT / ZDV) – T2	Entre grupos	5.823	3	1.941	3.101	0.037
	Dentro de grupos	26.286	42	0.626		
	Total	32.109	45			
Estavudina (D4T) – T1	Entre grupos	5.862	3	1.954	1.653	0.192
	Dentro de grupos	49.638	42	1.182		
	Total	55.500	45			
Estavudina (D4T) – T2	Entre grupos	6.051	3	2.017	2.593	0.065
	Dentro de grupos	32.667	42	0.778		
	Total	38.717	45			
Didanosina (DDI) – T1	Entre grupos	6.507	3	2.169	1.860	0.151
	Dentro de grupos	48.971	42	1.166		
	Total	55.478	45			

Didanosina (DDI) – T2	Entre grupos	4.966	3	1.655	2.765	0.054
	Dentro de grupos	25.143	42	0.599		
	Total	30.109	45			
Emtricitabina (FTC) – T1	Entre grupos	9.133	3	3.044	2.458	0.076
	Dentro de grupos	52.019	42	1.239		
	Total	61.152	45			
Emtricitabina (FTC) – T2	Entre grupos	6.451	3	2.150	1.499	0.229
	Dentro de grupos	60.267	42	1.435		
	Total	66.717	45			
Tenofovir (TDF) – T1	Entre grupos	4.727	3	1.576	1.481	0.233
	Dentro de grupos	44.686	42	1.064		
	Total	49.413	45			
Tenofovir (TDF) – T2	Entre grupos	3.159	3	1.053	2.654	0.061
	Dentro de grupos	16.667	42	0.397		
	Total	19.826	45			

Tabla 18. ANOVA de la aparición de la resistencia adquirida a los Inhibidores no Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa en ambos tiempos.

INHIBIDORES NO NUCLEÓSIDOS DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA						
Antirretrovirales		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P
Efavirenz (EFV) - T1	Entre grupos	9.870	3	3.290	3.173	0.034
	Dentro de grupos	43.543	42	1.037		
	Total	53.413	45			
Efavirenz (EFV) – T2	Entre grupos	9.514	3	3.171	3.539	0.023
	Dentro de grupos	37.638	42	0.896		
	Total	47.152	45			
Etravirina (ETV) - T1	Entre grupos	2.697	3	0.899	3.359	0.028
	Dentro de grupos	11.238	42	0.268		
	Total	13.935	45			
Etravirina (ETV) – T2	Entre grupos	2.697	3	0.899	2.478	0.074
	Dentro de grupos	15.238	42	0.363		
	Total	17.935	45			
Nevirapina (NVP) - T1	Entre grupos	9.402	3	3.134	2.986	0.042
	Dentro de grupos	44.076	42	1.049		
	Total	53.478	45			
Nevirapina (NVP) – T2	Entre grupos	9.666	3	3.222	3.414	0.026
	Dentro de grupos	39.638	42	0.944		
	Total	49.304	45			
Rilpivirina (RPV) - T1	Entre grupos	3.727	3	1.242	1.790	0.164
	Dentro de grupos	29.143	42	0.694		
	Total	32.870	45			
Rilpivirina (RPV) – T2	Entre grupos	3.417	3	1.139	1.917	0.141
	Dentro de grupos	24.952	42	0.594		
	Total	28.370	45			

C) Descripción de frecuencias y porcentajes de la variables intervinientes y moleculares (% subtipo B y no B).

Se realizó la descripción de las variables intervinientes (epidemiológicas), las también descritas en una tabla resumen (Tabla 4). De acuerdo a la Tabla 19, se logró hallar el porcentaje de las conductas o factores de riesgo asociados al VIH en esta población como: preferencia sexual, contacto sexual con TS, consumo de drogas y uso del preservativo, datos que fueron calculados en Excel. Así mismo, se calcularon los porcentajes de los subtipos del VIH-1, diferenciándose la predominancia del subtipo en la región del marcador molecular analizado (*Gag* = Subtipo A1; *Pol* = CRF02_AG) ambas con el 1.9%. (Tabla 20)

Además, se calcularon los porcentajes del recuento de CD4 y la carga viral del VIH-1, en ambos tiempos de toma de muestra durante el período 2015 – 2018, datos que fueron almacenados en una base de datos en Excel y detallados en la Tabla 21 y 22.

Tabla 19. Descripción de frecuencias y porcentajes de las variables epidemiológicas en los militares peruanos con VIH-1 de Lima y Callao, 2015 – 2018.

Variable (Tipo)	Medición de la variable	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Edad (Cuantitativa)	<30	3	5.8	5.8	5.8
	30-39	7	13.5	13.5	19.2
	40-49	16	30.8	30.8	50.0
	>50	26	50.0	50.0	100.0
	Total	52	100.0	100.0	
Preferencia sexual (Cualitativa)	Bisexual	3	5.8	5.8	5.8
	Heterosexual	45	86.5	86.5	92.3
	Homosexual	1	1.9	1.9	94.2
	No declaró	3	5.8	5.8	100.0
	Total	52	100.0	100.0	
Contacto sexual con TS (Cualitativa)	NO	43	82.7	82.7	82.7
	No declaró	1	1.9	1.9	84.6
	SI	8	15.4	15.4	100.0
	Total	52	100.0	100.0	
Consumo de drogas (Cualitativa)	NO	50	96.2	96.2	96.2
	No declaró	1	1.9	1.9	98.1
	SI	1	1.9	1.9	100.0
	Total	52	100.0	100.0	
Uso del preservativo (Cualitativa)	No declaró	10	19.2	19.2	19.2
	Periódicamente	7	13.5	13.5	32.7
	Siempre	35	67.3	67.3	100.0
	Total	52	100.0	100.0	
ITS que no sea VIH (Cualitativa)	Hepatitis	3	5.8	5.8	5.8
	Herpes	5	9.6	9.6	15.4
	HVC	1	1.9	1.9	17.3
	No	29	55.8	55.8	73.1
	No declaró	13	25.0	25.0	98.1
	Sífilis	1	1.9	1.9	100.0
	Total	52	100.0	100.0	
TAR (Cualitativa)	NO	1	1.9	1.9	1.9
	No indica	2	3.8	3.8	5.8
	SI	49	94.2	94.2	100.0
	Total	52	100.0	100.0	
Forma de contagio (Cualitativa)	En blanco	2	3.8	3.8	3.8
	No precisa	6	11.5	11.5	15.4
	Sexual	44	84.6	84.6	100.0
	Total	52	100.0	100.0	

Tabla 20. Descripción de frecuencias y porcentajes de los subtipos del VIH-1 en los militares peruanos de Lima y Callao, 2015 – 2018.

Variable Cualitativa	Medición de la variable	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Región <i>Gag</i>	Indeterminado	6	11.5	11.5	11.5
	Subtipo A1	1	1.9	1.9	13.5
	Subtipo B	45	86.5	86.5	100.0
	Total	52	100.0	100.0	
Región <i>Pol</i>	Indeterminado	6	11.5	11.5	11.5
	Subtipo B	45	86.5	86.5	98.1
	CRF02_AG	1	1.9	1.9	100.0
	Total	52	100.0	100.0	

Tabla 21. Descripción de frecuencias y porcentajes del recuento de CD4 (células/mL) en los militares peruanos de Lima y Callao, 2015 – 2018.

Variable Cuantitativa	Medición de la variable	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
CD4 (células/mL) - T1	<200	2	3.8	3.8	3.8
	200-350	10	19.2	19.2	23.1
	350-500	11	21.2	21.2	44.2
	>500	29	55.8	55.8	100.0
	Total	52	100.0	100.0	
CD4 (células/mL) - T2	200-350	9	17.3	18.8	18.8
	350-500	12	23.1	25.0	43.8
	>500	27	51.9	56.3	100.0
	Total	48	92.3	100.0	
	Perdidos	4	7.7		
	Total	52	100.0		

Tabla 22. Descripción de frecuencias y porcentajes de la carga viral (copias/mL) del VIH-1 en los militares peruanos de Lima y Callao, 2015 – 2018.

Variable Cuantitativa	Medición de la variable	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
CV (copias/mL) - T1	<40 Indetectable	40	76.9	80.0	80.0
	<1000 copias	5	9.6	10.0	90.0
	>1000 copias	5	9.6	10.0	100.0
	Total	50	96.2	100.0	
	Perdidos	2	3.8		
	Total	52	100.0		
CV (copias/mL) - T2	<40 Indetectable	46	88.5	88.5	88.5
	<1000 copias	3	5.8	5.8	94.3
	>1000 copias	3	5.8	5.8	100.0
	Total	52	100.0	100.0	

5. Discusión

Según los análisis, se reitera la prevalencia del subtipo B en el Perú con el 97%, dato coincidente con Yabar *et al.*, 2012 y Russell *et al.*, 2000; lo que se evidenció en esta población, sin embargo, se reportó en un participante una forma recombinante circulante (CRF02_AG), cuyo análisis filogenético tuvo diferente alineamiento para ambos marcadores, ya que el fragmento amplificado *pol* (región de la *prt* y *rt*) presentó tanto al subtipo A como al G, pero el fragmento amplificado para *gag*, que comprende la región p24 – p7, se caracterizó por presentar solo al subtipo A, mientras que para la concatenación de marcadores (*gag-pol*), se observa el dominio del subtipo G, lo que demuestra la importancia del análisis filogenético de ambos marcadores para la determinación de las formas recombinantes.

Con relación al análisis del Test D de Tajima, todos los valores D fueron negativos, lo que indica eventos “cuellos de botella”, producto de la presión selectiva de los antirretrovirales, generando mutaciones no sinónimas, inserciones o deleciones (Tajima, 1989), por lo que no es posible asegurar que estos valores sean significativos, datos que coinciden con los reportados por Yabar, 2017, así como, también es concordante la determinación de la diversidad genética a nivel de nucleótidos, la que fue mayor en el gen *gag* (ambos tiempos), evidenciándose además un incremento en el segundo tiempo mediante la concatenación de genes.

Se identificó a la mutación K103KN en dos militares peruanos cuya carga viral fue de 8740 y 3970 copias/mL, con un recuento de CD4 de 252 y 287 células/mL, respectivamente, lo que podría sugerir, que sea una mutación relacionada con la falla virológica, dato relacionado con lo reportado por Namale *et al.*, 2019. Por lo tanto, la aparición de esta mutación responde al fracaso de la terapia y con ello la aptitud viral del subtipo B, elevándose la carga viral y disminuyendo el recuento linfocitario. Además, se identificaron las mutaciones D30N y L90M relacionadas con el fitness viral del VIH-1 del subtipo B, cuya presencia en el virus disminuye la capacidad replicativa hasta un 10%, lo que concuerda con aquellos participantes que se encontró este tipo de mutaciones, quienes no presentaron alta carga viral, por el contrario, mostraron niveles indetectables o <20copias/mL, estos hallazgos coinciden con los reportados por Santos & Soares, 2010, así como mencionar que un factor clave para la

aparición de cepas resistentes, y por lo tanto un incremento en la diversidad y recombinación genética, es la transcriptasa reversa (*rt*), ya que, al carecer de un sistema de corrección de exonucleasa, característico de las ADN polimerasas celulares, es propenso a la incorporación errónea de nucleótidos durante la síntesis de ADNc, que se integra en el genoma del huésped, produciendo una nueva variante. Esta incapacidad de reparación de la *rt* del VIH-1 confiere una alta tasa de mutaciones al virus (aproximadamente 5-10 nucleótidos de incorporaciones erróneas por genoma por ciclo viral), esto conlleva a un escape frecuente del sistema inmune del huésped y la aparición de cepas resistentes bajo presión selectiva del fármaco.

Por el contrario, no se encontraron a las mutaciones I437T/V en *gag* y L76V en la proteasa (*pol*) en los militares peruanos, mutaciones asociadas con la resistencia al Darunavir, por lo que, no hubo evidencia de resistencia al antirretroviral mencionado, dato discordante con lo reportado por Lambert-Niclot *et al.*, 2008, los que encontraron una asociación entre las mutaciones antes mencionadas. Por lo tanto, las variaciones dentro de las secuencias del gen *gag* pueden ser aún más intolerantes a las mutaciones, ya que codifican proteínas del núcleo, a diferencia de las variaciones dentro de las secuencias *pol*, que son particularmente relevantes para el acceso a los ARVs, ya que esta región codifica las proteínas *rt* y *prt*, contra las cuales se dirigen la mayoría de fármacos (Wainberg, 2004), es decir, las variaciones en estas regiones afectan la susceptibilidad a los medicamentos y el desarrollo de resistencia a los mismos. Así mismo, los resultados obtenidos del índice de resistencia hacia los grupos de inhibidores, donde se presentó la mayor resistencia hacia los INTR (primer tiempo: 19.6% y segundo tiempo: 18%), datos no concordantes con Wegner *et al.*, 2000; cuya prevalencia en militares estadounidenses fue del 4%, lo que podría sugerir que el VIH en el Perú presenta diferente divergencia genética en comparación con las cepas extranjeras y por lo tanto, diferentes niveles de resistencia a los grupos de inhibidores.

Se identificó a la mutación Y188YFHL asociada con resistencia a todos los INNTR en este estudio, dato relacionado con lo reportado por Rambaut, 2004, el que mencionó que la recombinación permite la aparición de cepas con múltiples mutaciones de resistencia o una sola mutación que puede generar resistencia a todo un grupo de inhibidores. Por otro lado, se resalta la importancia en la identificación de la variabilidad genética del VIH-1, especialmente en la aparición de cepas recombinantes, debido a que estas pueden diseminarse

rápidamente en poblaciones vulnerables o de alto riesgo, como en redes de transmisión sexual donde circulan diferentes subtipos, que pueden originar patrones complejos de transmisión en el país, datos concordantes reportados primero por Burke en 1997 y luego por Laguna-Torres *et al.*, 2005.

Con relación al comportamiento sexual, el servicio militar influye sobre el mayor número de parejas sexuales ocasionales, duplicando el número en comparación a la población general, ya sean factores como su relativa juventud o por sus actitudes, obteniendo un fuerte estímulo a través de la presión de grupo durante el entrenamiento o como parte de la “cultura” militar (ONUSIDA, 1998). Es así como los militares se encontrarían más expuestos al VIH y a otras ITS, teniendo la disposición de aceptar y asumir riesgos innecesarios, como tener contacto sexual arriesgado sin protección con otro grupo de alto riesgo, factores que coinciden con los reportados por Apolaya-Segura y Cárcamo-Cavagnaro, 2013; siendo un posible modelo de “población puente”, para la transmisión del virus de una población de alto riesgo (HSH y TS) hacia la población general. Es importante señalar que el contacto sexual sin protección entre sujetos previamente infectados puede originar infecciones mixtas, las que pueden generar una disminución de la respuesta inmunológica y consecuentemente acelerar el progreso al SIDA, dato mencionado y en concordancia con Allen *et al.*, 2003.

Finalmente, este estudio contribuyó con la identificación de las variantes genéticas del VIH-1 a partir de militares peruanos infectados y los cambios que ocurren en el perfil de resistencia a los ARVs durante uno a tres años de seguimiento, donde se siguió un diseño longitudinal de análisis de cohorte, para la evaluación y comparación de los eventos moleculares en ambos tiempos de toma de muestra del personal militar. Los resultados esperados permitieron determinar los factores que promueven la variación del virus, lo que en su conjunto ayudó a mejorar el TAR y consecuentemente la salud y el bienestar de la población estudiada.

6. Conclusiones

- ✓ Se identificó al subtipo B como el predominante en los militares peruanos, así como la importancia del análisis filogenético no sólo del gen *pol*, sino también del gen *gag*, en especial para las formas recombinantes del VIH-1.
- ✓ Se demostró un incremento para el segundo tiempo del 0.030833 al 0.045609 de la diversidad genética a nivel de nucleótidos del VIH-1, además de la identificación de eventos recombinantes con otros subtipos como BF1, BD y una forma recombinante del tipo CRF02_AG.
- ✓ Se identificaron a las mutaciones M41LM, M184MV y L210LW, que confieren resistencia a todos los INTR, y la mutación M184V relacionada con un alto nivel de resistencia a Lamivudina (3TC) y Emtricitabina (FTC); mutaciones relacionadas con la resistencia a los IP como M46IM, I54V, V82AV y L90LM; y la mutación Y188YFHL que mostró resistencia a todos los INNTR.
- ✓ Se determinó a los principales factores de riesgo relacionados con la variabilidad y transmisibilidad del VIH-1 en los militares peruanos, así como el recuento de CD4 y el monitoreo de la carga viral del VIH-1 como indicadores del fracaso de la terapia antirretroviral.

7. Recomendaciones

- ✓ Para esta investigación solo se trabajó con dos primers tanto en la primera como la segunda ronda de PCR para la amplificación del fragmento *Gag*, por lo que se recomendaría diseñar o trabajar con primers alternativos para lograr obtener una mayor sensibilidad de amplificaciones en la PCR.
- ✓ Se recomendaría en los trabajos posteriores realizar un secuenciamiento masivo (NGS) para captar poblaciones minoritarias (<1%), ya que el método de Sanger tiene una captación poblacional viral del 20%, lo que ayudaría a obtener mayor información sobre las cepas o formas circulantes minoritarias en los pacientes.

8. Referencias bibliográficas

- Allen TM, Altfeld M. (2003). HIV-1 superinfection. *J Allergy Clin Immunol.*; 112(5):829-35.
- Apolaya-Segura M, Cárcamo-Cavagnaro C. (2013). Influencia del servicio militar voluntario sobre el comportamiento sexual de una población de jóvenes. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 30(3):386-92.
- Applied Biosystems. Argentina Approves Applied Biosystems ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System Version 2 for Diagnostic Procedures. (2000). (Acceso Julio de 2010). Disponible en: http://www6.appliedbiosystems.com/press_releases/argentina
- Applied Biosystems, Brazilian National Ministry of Health Sign Agreement for Large-Scale, HIV-1 Genotyping Study. (2001). (Acceso: Julio 2010). Disponible en: <http://www.applera.com/corpcomm/applerapress.nsf/printer/F39A6DECCE317E4388256C140000439F?openDocument>.
- Avila-Rios, S., Sued, O., Rhee, S., Shafer R., Reyes-Teran, G., Ravasi, G. (2016). Surveillance of HIV Transmitted Drug Resistance in Latin America and the Caribbean: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Plos One*, 11(6):e0158560. doi: 10.1371/journal.pone.0158560
- Babajide K, Ayemoba O, Terfa K, Ake J, Crowell TA, Adamu Y, Mohammed T, Okoye I, Odeyemi S, Crawford K, Hughes L, Akintunde E, Umar T, Hamm TE, Njoku OS. (2017). Virological Suppression and Patterns of Resistance Amongst Patients on Antiretroviral Therapy at 4 Nigerian Military Hospitals. *Curr HIV Res.*, 15(2):146-151. doi: 10.2174/1570162X15666170517103704.
- Berger EA, Murphy PM, Farber JM. (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol.*;17:657-700.
- Boletín Instituto Nacional de Salud. (2008). Boletín: El 1º de abril se inicia la evaluación de la resistencia del VIH por genotipificación para pacientes en TARGA.
- Brodine SK, Shaffer RA, Starkey MJ, Tasker SA, Gilcrest JL, Louder MK, Barile A, VanCott TC, Vahey MT, McCutchan FE, Birx DL, Richman DD, Mascola JR. (1999). Drug resistance patterns, genetic subtypes, clinical features, and risk factors in military personnel with HIV-1 seroconversion. *Ann Intern Med.*,131(7):502-6.
- Burke DS. (1997). Recombination in HIV: An Important viral evolutionary strategy. *Emerg Infect Dis*; 3(3): 253-58.
- Casañas, M. (2008). Modelos de interpretación de la resistencia del Virus de la Inmunodeficiencia Humana a los fármacos antirretrovirales. Valoración de la capacidad predictoria de la respuesta virológica. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología, Universidad de Granada.

- Carrión, A. G., Laguna-Torres, V. A., Soto-Castellares, G., Castillo, M., Salazar, E., Negron, E., ... Kochel, T. J. (2009). Molecular characterization of the human immunodeficiency virus type 1 among children in Lima, Peru. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 25(8), 833-835. <https://doi.org/10.1089/aid.2009.0016>
- Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. (2018). Boletín mensual diciembre 2018: Situación epidemiológica del VIH-SIDA en el Perú. Ministerio de Salud. Perú.
- Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH/SIDA. (2009). VIH/SIDA y Salud Pública. Manual para personal de salud. México: Instituto Nacional de Salud Pública. Recuperado de <http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/biblioteca/manualvihsidaysaludpub.pdf>
- Centro Nacional de Salud Pública - Instituto Nacional de Salud (2017). Método de Genotipificación del VIH (Susceptible). Ed.01.
- Centro Nacional de Salud Pública - Instituto Nacional de Salud (2016). Método de ensayo de PCR ADN Proviral para el diagnóstico del VIH-1. Ed. 01.
- Cen S, Huang Y, Khorchid A, Darlix JL, Wainberg MA, Kleiman L. (1999). The role of Pr55(gag) in the annealing of tRNA³Lys to human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA. *J Virol*, 73(5):4485-8.
- Chermann, J.C., Barré-Sinoussi, F., Dauguet, C., Brun-Vezinet, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L. (1983). Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Antibiot Chemother*, 32: p. 48-53.
- Clavel F, Hoggan MD, Willey RL, Strebel K, Martin MA, Repaske R. (1989). Genetic recombination of human immunodeficiency virus. *Journal of virology.*, 63(3):1455-9.
- Coffin, JM. (1995). HIV population dynamics in vivo: Implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 267: 483-488
- Codina, C., Martín, T.M., Ibarra, O. (2002). La infección por el virus de la Inmunodeficiencia Humana. *Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria*, 21:p. 1493-1516.
- Dawson L, Yu XF. (1998). The role of nucleocapsid of HIV-1 in virus assembly. *Virology*, 251(1):141-57.
- Delwart EL, Herring B, Rodrigo AG, Mullins JI. (1995). Genetic Subtyping of Human Immunodeficiency Virus Using a Heteroduplex Mobility Assay. *PCR Methods Appl*; 4:S202-S216.
- De Cock, K.M., Adjuorlolo, G., Ekpini, E., Sibailly, T., Kouadio, J., Maran, M., Brattegaard, K., Vetter, K.M., Doorly, R., Gayle, H.D. (1993). Epidemiology and transmission of HIV-2. Why there is no HIV-2 pandemic. *Jama*, 270(17): p. 2083-6.

- Dirección General de Epidemiología. (2015). Situación del VIH-SIDA en el Perú. Boletín epidemiológico.
- Dirección General de Epidemiología. (2016). Situación del VIH-SIDA en el Perú. Boletín epidemiológico.
- Dirección General de Epidemiología. (2018). Situación Actual del VIH-SIDA en el Perú. Boletín epidemiológico.
- Domingo E, Holland JJ. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol.*; 51:151-78.
- Draenert, R., S. Le Gall, K. J. Pfafferott, A. J. Leslie, P. Chetty, C. Brander, E. C. Holmes, S. C. Chang, M. E. Feeney, M. M. Addo, L. Ruiz, D. Ramduth, P. Jeena, M. Altfeld, S. Thomas, Y. Tang, C. L. Verrill, C. Dixon, J. G. Prado, P. Kiepiela, J. Martinez-Picado, B. D. Walker, and P. J. Goulder. (2004). Immune selection for altered antigen processing leads to cytotoxic T lymphocyte escape in chronic HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 199:905–915.
- Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF. (1998). Rates of spontaneous mutation. *Genetics*; 148: 1667-1686.
- Feng YX., Campbell S., Harvin D, Ehresmann B, Ehresmann C, Rein A. (1999). The human immunodeficiency virus type 1 *Gag* polyprotein has nucleic acid chaperone activity: possible role in dimerization of genomic RNA and placement of tRNA on the primer binding site. *J. Virol.*, 73, 4251–4256.
- Fernández-Caballero, J. (2017). Resistencia a antirretrovirales: nuevos métodos de detección, nuevas aplicaciones. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- Freed, E.O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol* 13, 484-496.
- García, F. J. (2019). Rol de los componentes del complejo nuclear de unión al cap, CBP80 y CTIF, en la síntesis de la proteína estructural Gag de VIH-1. Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias con mención Microbiología. Universidad de Chile (USACH).
- Gómez, L. (2012). Resistencia antirretroviral y variantes genéticas del VIH-1 em pacientes cubanos com fallo a la terapia. Tesis para optar el grado de Máster em Ciencias. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Cuba.
- Gonda, M.A., Wong-Staal, F., Gallo, R. C., Clements, J. E., Narayan, O., Gilden, R.V. (1985). Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenyc lentivirus. *Science*, 227(4683): p.173-7.
- Goulder, P. J., C. Brander, K. Annamalai, N. Mngqundaniso, U. Govender, Y. Tang, S. He, K. E. Hartman, C. A. O'Callaghan, G. S. Ogg, M. A. Altfeld, E. S. Rosenberg, H. Cao, S. A. Kalams, M. Hammond, M. Bunce, S. I. Pelton, S. A. Burchett, K. McIntosh, H. M. Coovadia, and B. D. Walker. (2000). Differential narrow focusing

- of immunodominant human immunodeficiency virus *Gag*-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in infected African and Caucasoid adults and children. *J. Virol.* 74:5679–5690.
- Guimarães, ML., Velarde-Dunios, K., Segurondo, D., Morgado, M. (2012). The HIV-1 epidemic in Bolivia is dominated by subtype B and CRF12_BF "family" strains. *J. Virol.* 9:19.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- HIV sequence database. The Circulating Recombinant Forms (CRFs). Update Jun 7, 2010. (Acceso: Julio 2010). Disponible en: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html#CRF48>
- Hu WS, Temin HM. (1990). Retroviral recombination and reverse transcription. *Science.*, 250(4985):1227-33.
- Instituto Nacional de Salud (2003). Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Serie de Normas Técnicas N°38.
- Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. AIDS and the Military: UNAIDS Point of View. Geneva: UNAIDS Best Practice Collection; 1998.
- Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO). AIDS epidemic update: June 2016.
- Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO). AIDS epidemic update: 2017
- Jones, N. A., X. Wei, D. R. Flower, M. Wong, F. Michor, M. S. Saag, B. H. Hahn, M. A. Nowak, G. M. Shaw, and P. Borrow. (2004). Determinants of human immunodeficiency virus type 1 escape from the primary CD8₊ cytotoxic T lymphocyte response. *J. Exp. Med.* 200:1243–1256.
- Karn, J. and Stoltzfus, C. (2012). Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2, a006916.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16, 111-120.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. (1994). MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Comput Appl Biosci.*, 10(2):189-91.
- Kiepiela, P., A. J. Leslie, I. Honeyborne, D. Ramduth, C. Thobakgale, S. Chetty, P. Rathnavalu, C. Moore, K. J. Pfafferott, L. Hilton, P. Zimbwa, S. Moore, T. Allen, C. Brander, M. M. Addo, M. Altfeld, I. James, S. Mallal, M. Bunce, L. D. Barber, J. Szinger, C. Day, P. Klennerman, J. Mullins, B. Korber, H. M. Coovadia, B. D. Walker,

- and P. J. Goulder. (2004). Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* 432:769–775.
- Kuiken C., Thakallapalli R., Eskild A., de Ronde A. (2000). Genetic analysis reveals epidemiologic pattern in the spread of human immunodeficiency virus. *American Journal of Epidemiology*, 152(9): 814-822
- Lama JR, Sanchez J, Suarez L, Caballero P, Laguna A, Sanchez JL et al. (2006). Linking HIV and antiretroviral drug resistance surveillance in Peru: a model for a third-generation HIV sentinel surveillance. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 42(4):501-5.
- Lambert-Niclot S, Flandre P, Malet I, Canestri A, Soulié C, Tubiana R, Brunet C, Wiriden M, Katlama C, Calvez V, Marcelin AG. (2008). Impact of gag mutations on selection of darunavir resistance mutations in HIV-1 protease. *J Antimicrob Chemother*. 62(5):905-8. doi: 10.1093/jac/dkn338.
- Lasky, L. A., Nakamura, G., Smith, D. H., Fennie, C., Shimasaki, C., Patzer, E., Berman, P., Gregory, T., and Capon, D. J. (1987). Delineation of a region of the human immunodeficiency.
- Laguna-Torres VA, Olson J, Sanchez J, Montano S, Chauca G, Romero A, et al. (2005). Distribución de los subtipos del VIH-1 en nueve países de América del Sur, 1995-2002. *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Publica.*, 22(1):12-17.
- Leslie, A. J., K. J. Pfafferoth, P. Chetty, R. Draenert, M. M. Addo, M. Feeney, Y. Tang, E. C. Holmes, T. Allen, J. G. Prado, M. Altfeld, C. Brander, C. Dixon, D. Ramduth, P. Jeena, S. A. Thomas, A. St John, T. A. Roach, B. Kupfer, G. Luzzi, A. Edwards, G. Taylor, H. Lyall, G. Tudor-Williams, V. Novelli, J. Martinez-Picado, P. Kiepiela, B. D. Walker, and P. J. Goulder. (2004). HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat. Med.* 10:282–289.
- Llano, A. (2004). Factores del huésped que afectan a la progresión de la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana de tipo 1 (VIH-1). Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Li J, Lu JF, Dong HH, Bao ZY, Liu SY, Li HP, Zhuang DM, Liu YJ, Li H, Wang Z, Wu H, Li JY. (2006). Phenotypic resistance of resistant strains of HIV type-1 subtype B in China. *Chin Med J (Engl)*., 119(23):1972-7.
- McMichael, A., and P. Klenerman. (2002). HIV/AIDS. HLA leaves its footprints on HIV. *Science* 296:1410–1411.
- McMichael, A. J., and S. L. Rowland-Jones. (2001). Cellular immune responses to HIV. *Nature* 410:980–987.
- Manigart O, Courgnaud V, Sanou O, Valea D, Nagot N, Meda N, et al. (2004). HIV-1 superinfections in a cohort of commercial sex workers in Burkina Faso as assessed by an autologous heteroduplex mobility procedure. *AIDS*., 18(12):1645-51.

- Martin DP, Williamson C, Posada D. (2005). RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics.*, 21(2):260-2.
- Meng ZF, Zhang XY, Xin RL, Xing H, He X, Xu JQ, Shao YM. (2011). A new approach for sequencing virion genome of Chinese HIV-1 strains subtype B and BC from plasma. *Chin Med J (In English).*, 124(2):304-8.
- Método de ensayo del Centro Nacional de Salud Pública - INS. (2017). Genotipificación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) Suceptibilidad. Ed. 01.
- MINSA: A Step Forward in the Fight Against AIDS. (2006). In. Lima: Ministerio de Salud del Peru (MINSA): The first two years of universal access to antiretroviral treatment in Peru.
- Myers JE, Taylor BS, Rojas Fermín RA, Reyes EV, Vaughan C, José L *et al.* (2012). Transmitted drug resistance among antiretroviral-naïve patients with established HIV type 1 infection in Santo Domingo, Dominican Republic and review of the Latin American and Caribbean literature. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 28(7):667-74.
- Nadai Y, Eyzaguirre LM, Constantine NT, Sill AM, Cleghorn F, Blattner WA *et al.* (2008). Protocol for nearly full-length sequencing of HIV-1 RNA from plasma. *PLoS One.*, 3(1):e1420.
- Namale G, Kamacooko O, Bagiire D, Mayanja Y, Abaasa A, Kilembe W, Price M, Ssemwanga D, Lunkuse S, Nanyonjo M, Ssenyonga W, Mayaud P, Newton R, Kaleebu P, Seeley J. (2019). Sustained virological response and drug resistance among female sex workers living with HIV on antiretroviral therapy in Kampala, Uganda: a cross-sectional study. *Sex Transm Infect.* 95(6):405-411. doi: 10.1136/sextrans-2018-053854.
- Nájera I, Holguín A, Quiñones-Mateu ME, Muñoz-Fernández MA, Nájera R, López-Galíndez C, Domingo E. (1995). Pol gene quasispecies of human immunodeficiency virus: mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy. *J Virol.*, 69: 23-31.
- Nei M. and Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Nueva York.
- Nisole, S., and Saib, A. (2004). Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology* 1, 9.
- Nopkesorn T, Mock PA, Mastro TD, Sangkharomya S, Sweat M, Limpakarnjanarat K *et al.* (1998). HIV-1 subtype E incidence and sexually transmitted diseases in a cohort of military conscripts in northern Thailand. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 18(4):372-9.
- Peters H. O., Mendoza M. G., Capina R. E., Luo M., Mao X., Gubbins M., Nagelkerke N. J., MacArthur I., Sheardown B. B., Kimani J., Wachichi C., Thavaneswaran S., Plummer

- F. A. (2008). An Integrative Bioinformatic Approach for Studying Escape Mutations in Human Immunodeficiency Virus Type 1 *gag* in the Pumwani Sex Worker Cohort. *JOURNAL OF VIROLOGY*., 82(4):1980-1992
- Pinto ME, Struchiner CJ 2006. HIV-1 diversity: a tool for studying the pandemic. *Reports in Public Health* 22: 473-484.
- Piantadosi A, Chohan B, Panteleeff D, Baeten JM, Mandaliya K, Ndinya-Achola JO et al. (2009). HIV-1 evolution in *gag* and *env* is highly correlated but exhibits different relationships with viral load and the immune response. *AIDS*., 23(5):579-87
- Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, et al. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature medicine*.,15(8):871-2.
- Popper, S.J., Sarr, A.D., Travers, K. U., Gueye-Ndiaye, A., Mboup, S., Essex, M.E., Kanki, P.J. (1999). Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *J Infect Dis*., 188(4): p. 1116-21.
- Rambaut A, Posada D, Crandall KA, Holmes EC. (2004). The causes and consequences of HIV evolution. *Nat Rev Genet*. 5(1):52-61.
- Rath, B. A., von Kleist, M., Castillo, M. E., Kolevic, L., Caballero, P., Soto-Castellares, G., ... Oberhelman, R. A. (2013). Antiviral resistance and correlates of virologic failure in the first cohort of HIV-infected children gaining access to structured antiretroviral therapy in Lima, Peru: a cross-sectional analysis. *BMC Infectious Diseases*, 13, 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-1>
- Requejo HI. (2006). Worldwide molecular epidemiology of HIV. *Rev Saude Publica*., 40(2):331-45.
- Russell, K. L., Carcamo, C., Watts, D. M., Sanchez, J., Gotuzzo, E., Euler, A., Blanco, J. C., Galeano, A., Alava, A., Mullins, J. I., Holmes, K. K., Carr, J. K. (2000). Emerging genetic diversity of HIV-1 in South America. *AIDS*., 14(12):1785-91.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. Ed. 2nd.
- Santos, A. F., & Soares, M. A. (2010). HIV Genetic Diversity and Drug Resistance. *Viruses*, 2(2), 503-531. <https://doi.org/10.3390/v2020503>
- Shafer RW. (2002). Genotyping testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev*. 15(2): 247-77.
- Soria, J., Bull, M., Mitchell, C., La Rosa, A., Dross, S., Kraft, K., ... Frenkel, L. (2012). Transmitted HIV resistance to first-line antiretroviral therapy in Lima, Peru. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 28(4), 333-338. <https://doi.org/10.1089/aid.2011.0131>

- Soriano V, Briones C, Gomez-Cano M, Perez-Olmeda M, de Medndoza C. (1999). Resistencia a los farmacos antirretroviricos. In: Soriano V, Gonzalez-Lahoz J, editors. Manual del SIDA: IDEPSA. p. 739-52.
- Stanford University. Stanford Protocol Manual. Revision 01-10-2008.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. y Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Tajima F. (1989). Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tajima F. (1993). Simple methods to test molecular clock hypotheses. *Genetics* 135: 599-607.
- Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. (2008). The challenge of HIV-1 subtype diversity. *The New England journal of medicine.*; 358(15):1590-602.
- Tebit DM, Nankya I, Arts EJ, Gao Y. (2007). HIV diversity, recombination and disease progression: how does fitness "fit" into the puzzle?. *AIDS Rev.*; 9(2):75-87. Review.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22(22):4673-80.
- Thomson MM, Najera R. (2005). Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update. *AIDS Rev.*; 7(4):210-24.
- Trebelcock WL, et al. (2019). HIV pretreatment drug resistance among cisgender MSM and transgender women from Lima, Peru. *Journal of the International AIDS Society*; 22:e25411.
- Urbaneja MA, Kane BP, Johnson DG, Gorelick RJ, Henderson LE, Casas-Finet JR. (1999). Binding properties of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein p7 to a model RNA: elucidation of the structural determinants for function. *J Mol Biol.*, 287(1):59-75.
- Van der Auwera G., Heyndrickx L. (2000). HIV-1 group M *gag* Heteroduplex Mobility Analysis (HMA) Subtyping Kit. Protocolo version 3.
- Wainberg, M. A. (2004). HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. *AIDS (London, England)*, 18 Suppl 3, S63-68.
- Wegner SA, Brodine SK, Mascola JR, Tasker SA, Shaffer RA, Starkey MJ, Barile A, Martin GJ, Aronson N, Emmons WW, Stephan K, Bloor S, Vingerhoets J, Hertogs K, Larder B. (2000). Prevalence of genotypic and phenotypic resistance to anti-retroviral drugs

in a cohort of therapy-naïve HIV-1 infected US military personnel. *AIDS*, 14(8):1009-15.

World Health Organization. HIV Drug Resistance. Global report on early warning indicators of HIV drug resistance. (2016). Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246219/1/9789241511179-eng.pdf?ua=1>

Yabar C., Chavez P., Varas Z, Rodriguez R. (2006). Identificación molecular de mutaciones puntuales relacionadas con resistencia a drogas en VIH-1 de pacientes peruanos. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 23(3):149-157.

Yabar C, Salvatierra J, Quijano E. (2007). Variabilidad del gen de la envoltura del VIH-1 en tres grupos humanos con diferentes conductas sexuales de riesgo para adquirir ITS-VIH. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 24(3):202-210.

Yabar, C. A., Salvatierra, J., & Quijano, E. (2008). Polymorphism, recombination, and mutations in HIV type 1 *gag*-infecting Peruvian male sex workers. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 24(11), 1405-1413. <https://doi.org/10.1089/aid.2008.0130>


Yabar CA, Acuña M, Caballero P. (2010). First report of HIV-1 subtypes C and H in Peru from HIV-infected patients receiving Highly Active Anti-Retroviral Therapy (HAART). XVIII International AIDS Conference. Abstract book.

Yabar, C. A., Acuña, M., Gazzo, C., Salinas, G., Cárdenas, F., Valverde, A., & Romero, S. (2012). New subtypes and genetic recombination in HIV type 1-infecting patients with highly active antiretroviral therapy in Peru (2008-2010). *AIDS Research and Human Retroviruses*, 28(12), 1712-1722. <https://doi.org/10.1089/AID.2012.0040>

Yabar, C.A. (2017). Eventos moleculares que afectan la evolución del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) en sujetos peruanos infectados, en Lima y Callao. Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Lima, Perú.

9. Anexos

Anexo 1

	FORMULARIO	FOR-CNSP-165
	AUTORIZACIÓN DE USO DEL MATERIAL BIOLÓGICO PARA LAS INVESTIGACIONES EN EL CENTRO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA.	Edición Nº 01

Mediante la presente se autoriza al investigador(a) principal (IP) el uso exclusivo del material biológico en las instalaciones del Centro Nacional de Salud Pública, según protocolo aprobado por el comité de investigación:

Nombre y Apellidos del IP: JONATHAN JESÚS KEVIN GUERRERO RODRIGUEZ

Unidad o Laboratorio: LAB. VTS-VIH/SIDA

Título de la investigación: “Diversidad genética y resistencia molecular del VIH-1 que infecta a militares peruanos de Lima y Callao, 2015- 2018”

Código AGISNET:

Periodo de ejecución (Fecha de inicio y fin de la investigación): Noviembre – Febrero

El material biológico objeto de la presente investigación corresponde a las siguientes muestras:

MUESTRAS DE SANGRE TOTAL

Las cuales fueron obtenidas a partir de: (marcar según corresponda)

Vigilancia () Proyecto de Investigación (X) Brote () Control de Calidad ()

Especificar: MUESTRAS DE SANGRE TOTAL

Para uso exclusivo en el protocolo de investigación mencionado, con el compromiso de garantizar la confidencialidad de la información obtenida a partir de las mismas y asegurar la aplicación de las medidas de bioseguridad para reducir el riesgo de exposición y de biocustodia para evitar el uso indebido del material biológico.

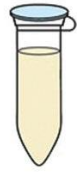
Esta autorización entrará en vigencia a partir de la aprobación del protocolo mediante Resolución Directoral de la Oficina General de Investigación y Transferencia Tecnológica.

Lima, 28 de noviembre del 2018

Firma y Sello
Director General del CNSP

Firma
Investigador Principal

Anexo 2. Flujograma de Extracción de ARN/ADN proviral.



Add Lysis Buffer A into microcentrifugation tube
Transfer the ground tissue to the Lysis Buffer A

Mix thoroughly

Add Lysis Buffer B and RNase A

Incubate 10 min at 65°C

Add Precipitation Solution

Incubate 5 min on ice

Centrifuge for 5 min

Collect supernatant



Add Plant gDNA Binding Solution and ethanol

Transfer the solution

to a GeneJET DNA purification column



Centrifuge 1 min



Discard flow-through
Add Wash Buffer I



Centrifuge 1 min
Discard flow-through



Add Wash Buffer II



Centrifuge 3 min
Discard flow-through and collect tube
Transfer spin column into 1.5 ml collection tube



Add 100 µl of Elution Buffer
Incubate 5 min



Centrifuge 1 min



Collect the flow-through

Anexo 3. Solución Clean Up

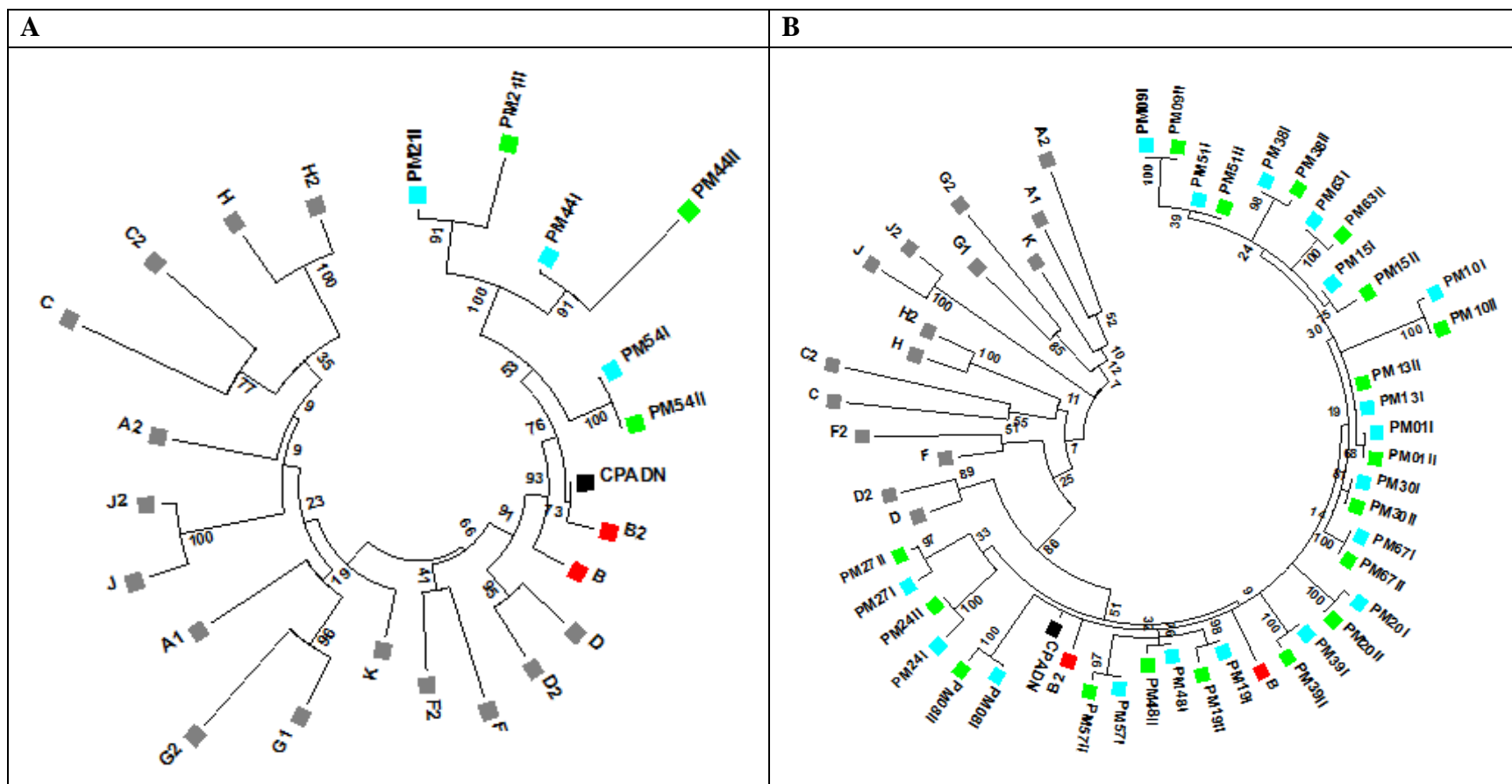
Componentes	Para 1 placa (µL)	Para 2 placas (µL)
Acetato de sodio 3M, pH 5.4	360	720
Etanol	7500	15000
H ₂ O grado molecular	1740	3480

Nota: Guardar la mezcla a -20°C hasta su uso.

Anexo 4. Aminoácidos, códigos de una y tres letras.

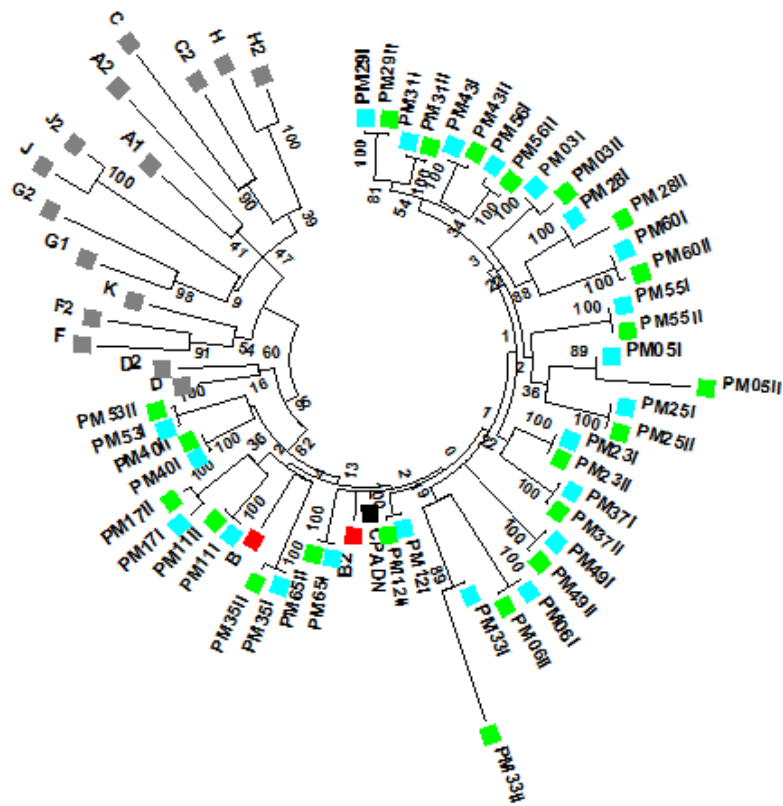
CÓDIGO (1 LETRA)	CÓDIGO (3 LETRAS)	AMINOÁCIDO
A	Ala	Alanina
R	Arg	Arginina
N	Asn	Asparagina
D	Asp	Aspartato
C	Cys	Cisteína
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido Glutámico
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
K	Lys	Lisina
M	Met	Metionina
F	Phe	Fenilalanina
P	Pro	Prolina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina
V	Val	Valina

Anexo 5. Árboles filogenéticos del gen *pol* del VIH-1.



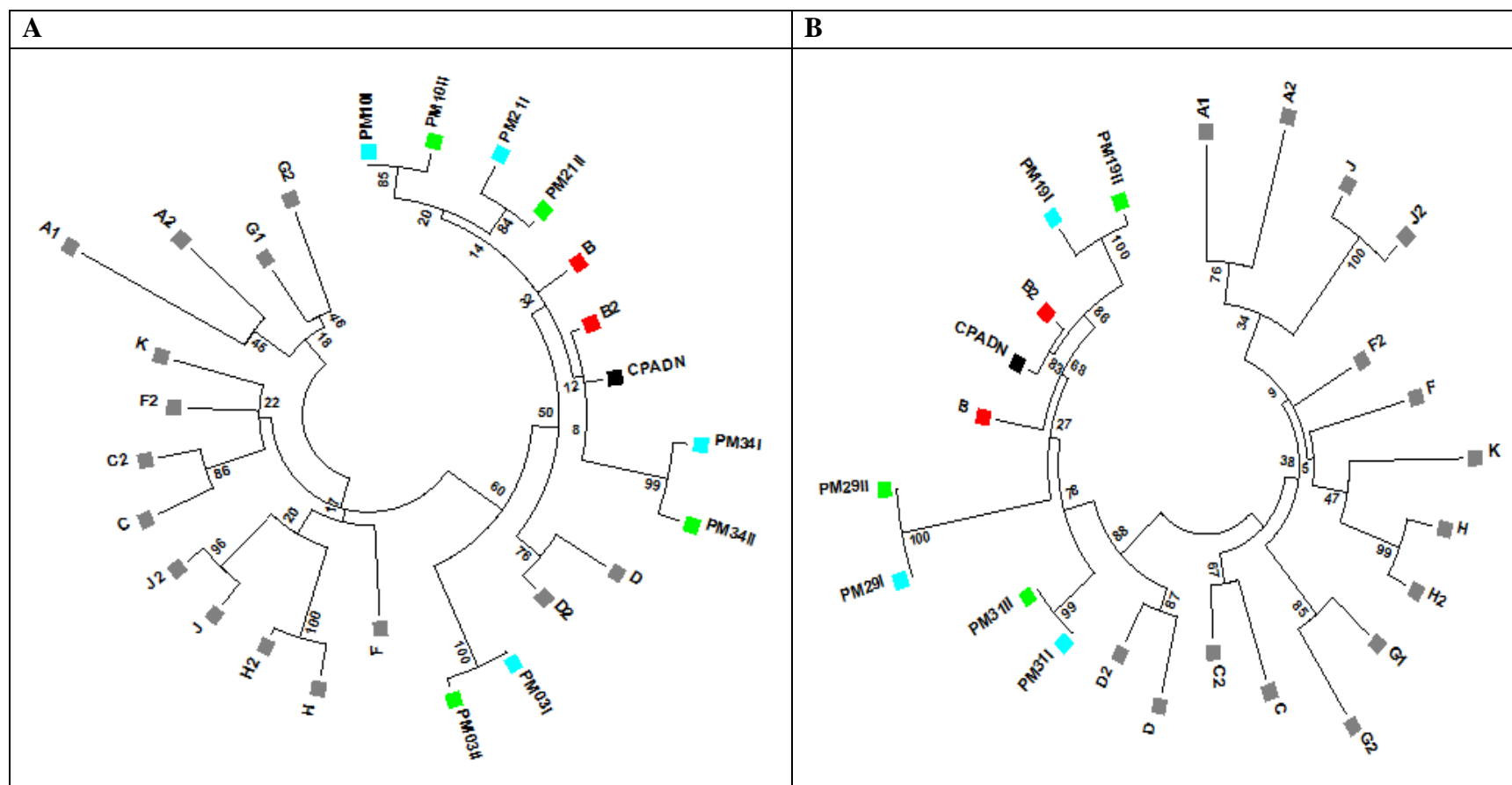
Anexo 5A y 5B. Árbol filogenético del gen *pol* del VIH-1 en la población militar (ambos tiempos). Método de Máxima Verosimilitud con 500 réplicas. Celeste = Primer tiempo – población militar; Verde = Segundo tiempo – población militar; Negro = Control Positivo ADN (cepa HXB2); Rojo = Subtipos B; Gris = Subtipos no B.

C



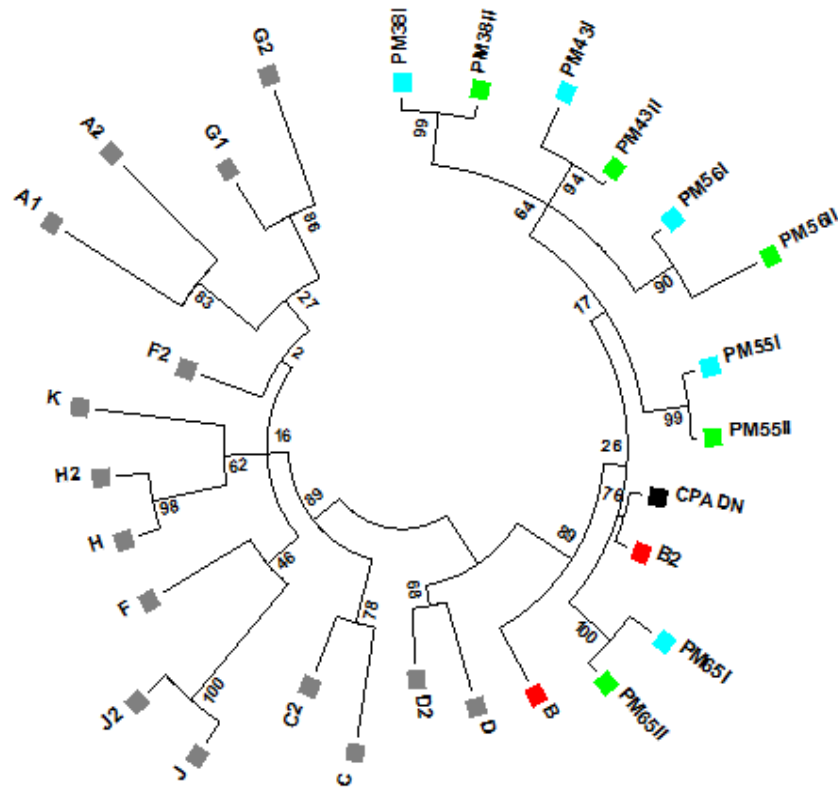
Anexo 5C. Árbol filogenético del gen *pol* del VIH-1 en la población militar (ambos tiempos). Método de Máxima Verosimilitud con 500 réplicas. Celeste = Primer tiempo – población militar; Verde = Segundo tiempo – población militar; Negro = Control Positivo ADN (cepa HXB2); Rojo = Subtipos B; Gris = Subtipos no B.

Anexo 6. Árboles filogenéticos del gen *gag* del VIH-1.



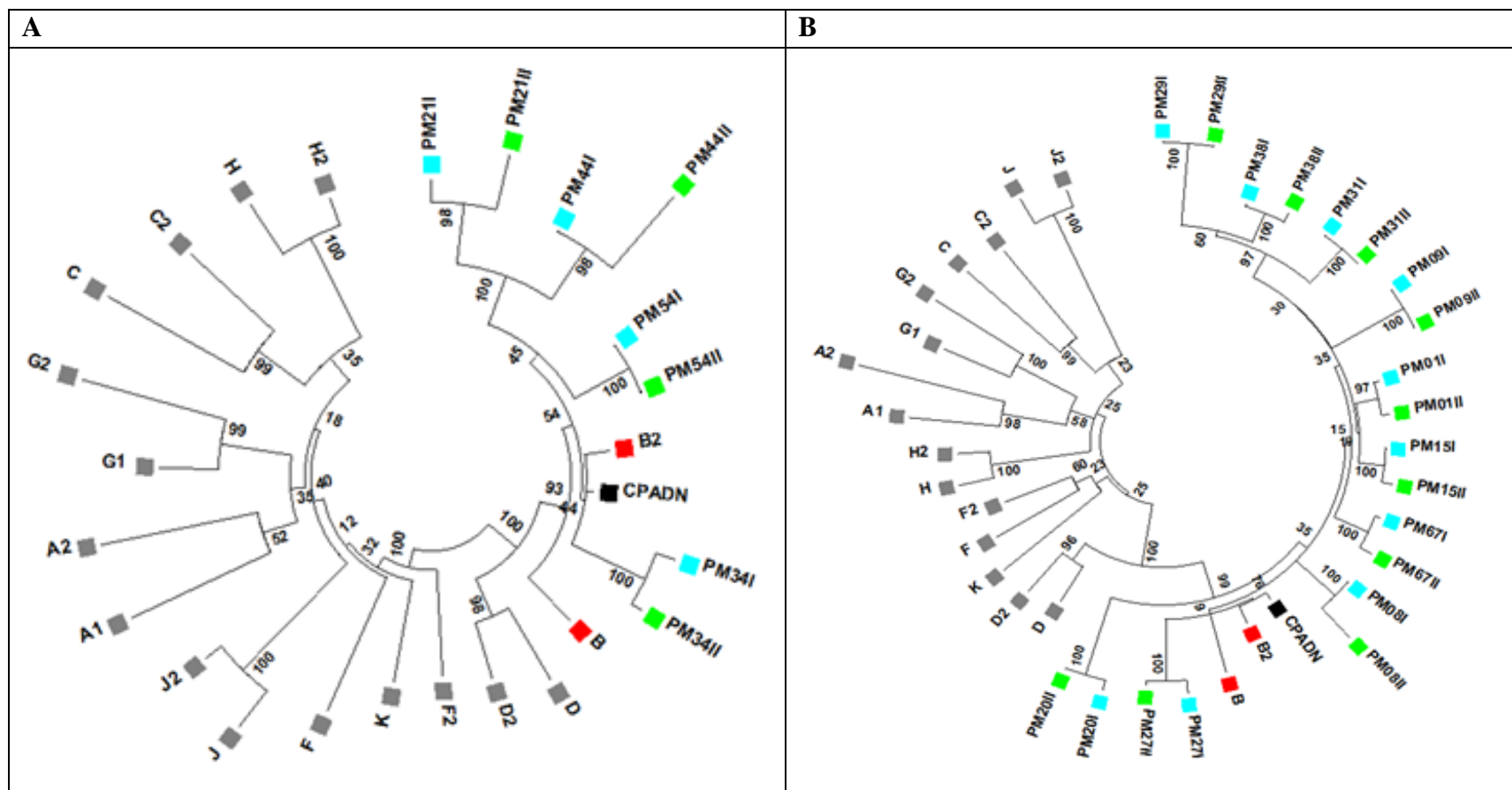
Anexo 6A y 6B. Árbol filogenético del gen *gag* del VIH-1 en la población militar (ambos tiempos). Método de Máxima Verosimilitud con 500 réplicas. Celeste = Primer tiempo – población militar; Verde = Segundo tiempo – población militar; Negro = Control Positivo ADN (cepa HXB2); Rojo = Subtipos B; Gris = Subtipos no B.

C



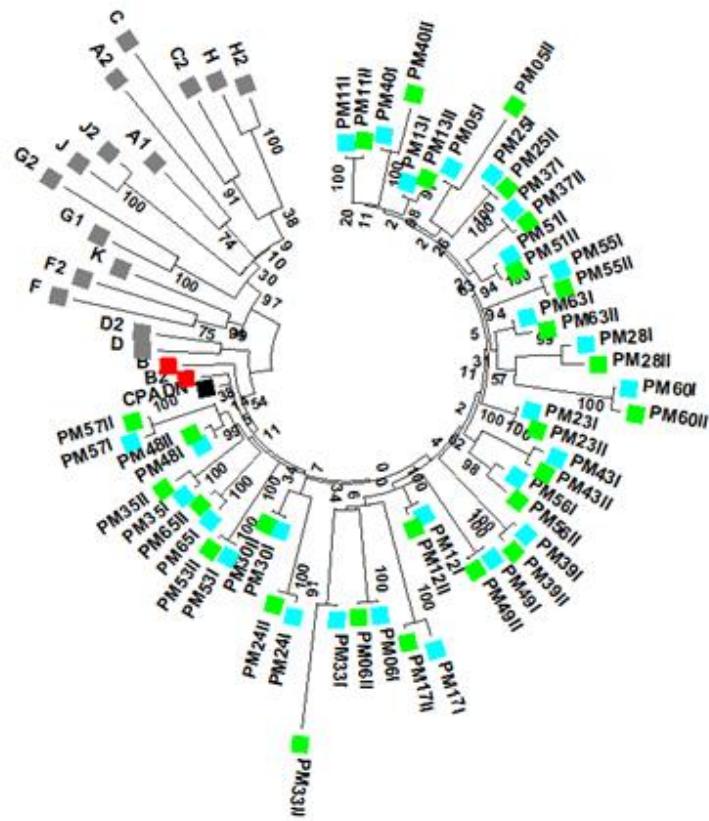
Anexo 6C. Árbol filogenético del gen *gag* del VIH-1 en la población militar (ambos tiempos). Método de Máxima Verosimilitud con 500 réplicas. Celeste = Primer tiempo – población militar; Verde = Segundo tiempo – población militar; Negro = Control Positivo ADN (cepa HXB2); Rojo = Subtipos B; Gris = Subtipos no B.

Anexo 7. Árboles filogenéticos de los genes concatenados (*gag-pol*) del VIH-1.



Anexo 7A y 7B. Árbol filogenético de los genes concatenados *gag-pol* del VIH-1 en la población militar (ambos tiempos). Método de Máxima Verosimilitud con 500 réplicas. Celeste = Primer tiempo – población militar; Verde = Segundo tiempo – población militar; Negro = Control Positivo ADN (cepa HXB2); Rojo = Subtipos B; Gris = Subtipos no B.

C



Anexo 7C. Árbol filogenético de los genes concatenados *gag-pol* del VIH-1 en la población militar (ambos tiempos). Método de Máxima Verosimilitud con 500 réplicas. Celeste = Primer tiempo – población militar; Verde = Segundo tiempo – población militar; Negro = Control Positivo ADN (cepa HXB2); Rojo = Subtipos B; Gris = Subtipos no B.

Anexo 8. Secuencias *Gag* del VIH-1 de los militares peruanos en ambos tiempos de toma de muestra.

[illegible]

PM131I	ACAAGGGGCAC	ATAGCCAAAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGAAAA	AAG---
PM151	AGAGGGGCAC	ATAGCCAGAA	ATTGTAGGGC	CCCTAGGAAA	AAGGGC
PM151I	AGAGGGGCAC	ATAGCCAGAA	ATTGTAGGGC	CCCTAGGAAA	AAGGGC
PM171	AGAGGGGCAC	ATAGCCAAAA	ATTGCAGGGC	TCCTAGAAAA	AAGGGC
PM171I	AGAAAGGGCAC	ATAGCCAAAA	ATTGCAGGGC	TCCTAGAAAA	AAGGGC
PM191	-----	-----	-----	-----	-----
PM191I	GATAGGGCAT	CTAGCCAAAA	ATTGCAG---	-----	-----
PM201	AGAAAGGCAC	ATAGCCAGAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC
PM201I	AGAAAGGCAC	ATAGCCAGAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGAAAA	AAGG--
PM211	-----	-----	-----	-----	-----
PM211I	-----	-----	-----	-----	-----
PM231	AGARGGGCAC	ATAGCYAAAA	ATTGCAGGGC	TCCTAGGAAA	AAGGGC
PM231I	AGAAAGGGCAC	ATAGCCAAAA	ATTGCAGGGC	TCCTAGGAAA	AAGGGC
PM241	AGAAAGGRCAT	ATAGCYAGAA	ATTGCAAGGC	CCCTAGGAAA	AAGGGC
PM241I	AGAAAGGGCAT	ATAGCTAGAA	ATTGCAAGGC	TCCTAGGAAA	AAGGGC
PM251	AGAAAGGGCAC	ATAGCAAAAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGGAAA	AAGG--
PM251I	AGAAAGGGCAC	ATAGCAAAAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC
PM271	AATAGGGGCAC	CTAGCCAGAA	ACTGCAAGGC	CCCTAGGAAA	AAGGGC
PM271I	AATAGGGGCAC	CTAGCCAGAA	ATTGCAAGGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC
PM281	AGAAAGGGCAC	ATAGCCAAAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC
PM281I	AGAAAGGGCAC	ATAGCCAGAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC
PM291	-----	-----	-----	-----	-----
PM291I	-----	-----	-----	-----	-----
PM301	AGAAAGGCAT	ATAGCCAGAA	ATTGCAAGGC	CCCTAGGAAA	AAGGGC
PM301I	AGAAAGGCAT	ATAGCCAGAA	ATTGCAAGGC	CCCTAGGAAA	AAGGGC
PM311	AGAAAGGGCAC	CTGGCCAAAA	ATTGCAGGGC	CCCTAG----	-----
PM311I	AGAAAGGGCAC	CTGGCCAAAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGAAAA	AGGGG-
PM321	AGAAAGGGCAC	ATAGCTAAAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC
PM321I	AGAAAGGGCAC	ATAGCTAAAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGAAAA	AAGG--
PM331	AGAAAGGGCAC	ATAGCCAAAA	ATTGCAGGGC	TCCTAGGAAA	AAGGGC
PM331I	AGAAAGGGCAC	ATAGCCAAAA	ATTGCAGGGC	TCCTAGGAAA	AAGG--
PM341	GGAAAGGGCAC	CTAGCCAGAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGGAAA	AAGGGC
PM341I	-----	-----	-----	-----	-----
PM351	AGAAAGGGCAC	ATAGCCAGAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGGAAA	AAGGGC
PM351I	AGAAAGGGCAC	ATAGCCAGAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGGAAA	AAGGGC
PM371	AGAAAGGGCAC	ATAGCCAAAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGGAAA	AAGGGC
PM371I	AGAAAGGGCAC	ATAGCCAAAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGGAAA	AAGGGC
PM381	AGAAAGGGCAC	CTAGCCAGAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC
PM381I	AGAAAGGGCAC	CTAGCCAGAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC
PM391	AGATGGGCAC	ATAGCTAGAA	ATTGCAGAGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC
PM391I	AGATGGGCAT	ATAGCTAGAA	ATTGCAGAGC	CCCTAGGAAA	AAGGGC
PM401	RGCAAGGGCAC	ATAGCCAAAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC
PM401I	RGCAAGGGCAC	ATAGCCAAAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC
PM431	AGAAAGGGCAC	CTGGCCAAAA	ATTGCAAGGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC
PM431I	GGAAAGGGCAC	CTGGCCAAAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGAAAA	AAG---
PM441	AGTAGGGGCAC	ATAGCCAAAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGGAAA	AAG---
PM441I	AGTAGGGGCAC	ATAGCCAAAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGGAAA	AAGGGC
PM481	GGAAAGGGCAT	ATAGCCAAAA	ATTGCAAGGC	CCCTAGGAAA	AAGGGC
PM481I	GGAAAGGGCAT	ATAGCCAAAA	ATTGCAAGGC	CCCTAGGAAA	AAGGGC
PM491	AATAGGGGCAC	ATAGCAAAAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC
PM491I	AATAGGGGCAC	ATAGCAAAAA	ATTGCAAGGC	CCCTAGAAAA	AAGG--
PM511	AGAAAGGGCAC	ATAGCAAAAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGGAAA	AAGGGC
PM511I	AGAAAGGGCAC	ATAGCAAAAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGGAAA	AAGGGC
PM531	AGAAAGGGCAC	ATAGCCAGAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGGAAA	AAGGGC
PM531I	AGAAAGGGCAC	ATAGCCAGAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGGAAA	AAGGGC
PM541	GGTAGGGGCAT	ATAGCCAAAA	ATTGCAAGGC	CCCTAGGAAA	AAGGGC
PM541I	GGTAGGGGCAT	ATAGCCAAAA	ATTGCAAGGC	CCCTAGGAAA	AAGGGC
PM551	AGAAAGGGCAC	ATAGCCAGAA	GTTGCAGGGC	CCCTAGGAAA	AARGG-
PM551I	AGAAAGGGCAC	ATAGCCAGAA	GTTGCAGGGC	CCCTAGGAAA	AARGG-
PM561	AGAAAGGGCAC	CTGGCCAAAA	ATTGCAAGGC	CCCTAGAAAA	AA----
PM561I	AGAAAGGGCAC	CTGGCCAAAA	ATTGCAAGGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC
PM571	GGAAAGGGCAT	ATAGCCAGAA	ATTGCAAGGC	TCCTAGGAAA	AAGG--
PM571I	GGAAAGGGCAT	ATAGCCAGAA	ATTGCAAGGC	TCCTAGGAAA	AAGG--
PM601	AGAAAGGGCAC	CTAGCCAGAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC
PM601I	AGAAAGGGCAC	CTAGCCAGAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC
PM621	AGAAAGGCAT	CTAGCCAGAA	ATTGCAAGGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC
PM621I	AGAAAGGCAT	CTAGCCAGAA	ATTGCAAGGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC
PM631	AGATGGGCAC	ATAGCCAAAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC
PM631I	AAATGGGGCAC	ATAGCCAAAA	ATTGCAGAGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC
PM651	AGCAGGGGCAC	ATAGCCAAAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC
PM651I	-----	-----	-----	-----	-----
PM671	GGAAAGGCAC	CTAGCCAGAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC
PM671I	GGAAAGGGCAC	CTAGCCAGAA	ATTGCAGGGC	CCCTAGAAAA	AAGGGC

Anexo 9. Secuencias *Pol* del VIH-1 de los militares peruanos en ambos tiempos de toma de muestra.

[illegible]

PM311I	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGC	TTGGTTGCAC	TCTAAATTTT
PM32I	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGC	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM32II	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGC	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM33I	ACATAAATTGG	AAGAAACCTG	TTGACTCAGA	TTGGCTGCAC	TTTAAATTTT
PM33II	ACATAAATTAG	AAGAAACCTA	TTGACTCAGA	TTAGCTGCAC	TTTAAATTTT
PM34I	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGA	TAGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM34II	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGA	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM35I	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGA	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM35II	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACCCAAA	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM37I	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACCCAGC	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM37II	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACCCAGC	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM38I	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGC	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM38II	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGC	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM39I	ATATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGA	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM39II	ATATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGA	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM40I	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGA	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM40II	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGA	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM43I	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGC	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM43II	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGC	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM44I	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGC	TTGGATGCAC	TTTAAATTTT
PM44II	ACATAAATTAG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGC	TTAGGTGCAC	TTTAAATTTT
PM48I	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGA	TTGGTTGCAC	YTAAATTTT
PM48II	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGA	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM49I	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGC	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM49II	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGC	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM51I	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGC	TTGGRTGCAC	TTTAAATTTT
PM51II	ACATAAAT--GG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGC	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM53I	ACATAAATTGG	AAGRAATCTG	TTGACTCAGA	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM53II	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGC	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM54I	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGA	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM54II	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGA	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM55I	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGC	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM55II	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGC	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM61I	ATATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACCCAGC	TTGGATGCAC	TTTAAATTTT
PM61II	ATATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACCCAGC	TTGGATGCAC	TTTAAATTTT
PM57I	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGA	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM57II	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGA	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM60I	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTAACYCAGC	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM60II	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTAACCCARC	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM62I	ACATAAATTGG	ACGAAATATG	TTGACTCAGA	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM62II	ACATAAATTGG	ACGAAATATG	TTGACTCAGA	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM63I	ATATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACCCAGC	TTGGRTGCAC	TTTAAATTTT
PM63II	ATATAAATTGG	AAGAGATCTG	TTGACCCAGC	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM65I	ACATAAATTGG	AAGAAATCTA	TTGACTCAGA	TTGGCTGCAC	CTTAAATTTT
PM65II	ACATAAATTGG	AAGAAATCTA	TTGACTCAAA	TTGGCTGCAC	TTTAAATTTT
PM67I	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGC	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT
PM67II	ACATAAATTGG	AAGAAATCTG	TTGACTCAGC	TTGGTTGCAC	TTTAAATTTT

[illegible]

PM49I	AGTTCCCTTA	CATGAAGACT	TCAGAAAGTA	CAC TGCAATT	ACCATACTTA
PM49II	AGTTCCCTTA	CATGAAGACT	TCAGAAAGTA	CAC TGCAATT	ACCATACTTA
PM51I	AGTTCCCTTA	GATAAAGACT	TCAGAAAGTA	TACTGCATTT	ACCATACTTA
PM51II	AGTTCCCTTA	GATAAAGACT	TCAGAAAGTA	TACTGCATTT	ACCATACTTA
PM53I	AGTTCCCTTA	GATAAAGACT	TTAGGAAAGTA	TACTGCATTT	ACCATACTTA
PM53II	AGTTCCCTTA	GATAAAGACT	TTAGGAAAGTA	TACTGCATTT	ACCATACTTA
PM54I	ARTTCCCTTA	CATGAAGACT	TCAGGAAAGTA	TACTGCATTT	ACCATACTTA
PM54II	-----	-----	-----	-----	-----
PM55I	AGTTCCCTTA	GATAAAGACT	TCAGAAAGTA	TACTGCATTT	ACCATACTTA
PM55II	AGTTCCCTTA	GATAAAGACT	TCAGAAAGTA	TACTGCATTT	ACCATACTTA
PM56I	AGTTCCCTTA	GATAAAGACT	TCAGAAAGTA	TACTGCATTT	ACCATACTTA
PM56II	AGTTCCCTTA	GATAAAGACT	TCAGAAAGTA	TACTGCATTT	ACCATACTTA
PM57I	AGTTCCCTTA	GATAAAGACT	TCAGGAAAGTA	TACTGCATTT	ACCATACTTA
PM57II	AGTTCCCTTA	GATAAAGACT	TCAGGAAAGTA	TACTGCATTT	ACCATACTTA
PM60I	AGTTCCCTTA	CATGAGACT	TTAGAAAGTA	TACTGCATTT	ACCATACTTA
PM60II	AGTTCCCTTA	CATGAGACT	TTAGAAAGTA	TACTGCATTT	ACCATACTTA
PM62I	AGTTCCCTTA	GATAAAGACT	TCAGAAAGTA	TACAGCATTC	ACTATACTTA
PM62II	AGTTCCCTTA	GATAAAGACT	TCAGAAAGTA	TACAGCATTC	ACTATACTTA
PM63I	AGTTCCCTTA	GATAAAGACT	TCAGAAAGTA	TACTGCATTT	ACCATACTTA
PM63II	AGTTCCCTTA	GATAAAGACT	TCAGAAAGTA	TACTGCATTT	ACCATACTTA
PM65I	AGTGCCCTTA	GATAAAGACT	TCAGGAAAGTA	TACTGCATTT	ACCATACTTA
PM65II	AGTGCCCTTA	GATAAAGACT	TCAGGAAAGTA	TACTGCATTT	ACCATACTTA
PM67I	AGTTCCCTTA	GATAAAGACT	TCAGAAAGTA	TACTGCATTT	ACCATACTTA
PM67II	AGTTCCCTTA	GATAAAGACT	TCAGAAAGTA	TACTGCATTT	ACCATACTTA

PM28I	GTGTAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTACTTCCA
PM28II	GTGTAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTACTTCCA
PM29I	GTATAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM29II	GTATAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM30I	GTACAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAARTACAA	TGTGCTTCCA
PM30II	GTACAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAARTACAA	TGTGCTTCCA
PM31I	GTATAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM31II	GTATAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM32I	GTATAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTACTCCCG
PM32II	GTATAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTACTCCCG
PM33I	GTACAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM33II	GTACAAACAA	TGAGACACC	AAGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM34I	GTACAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM34II	GTACAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTAYAA	TGTGCTTCCA
PM35I	GTACAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM35II	GTACAAATAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM37I	GTACAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM37II	GTACAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM38I	GTACAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM38II	GTACAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTAYAA	TGTGCTTCCA
PM39I	GTGTGAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM39II	GTGTGAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM40I	GTGTAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTACTTCCA
PM40II	GTGTAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTACTTCCA
PM43I	GTACAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCG
PM43II	GTACAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCG
PM44I	GTACCAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM44II	GTACCAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM46I	GTACAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTACTTCCA
PM46II	RTACAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTACTTCCA
PM49I	GTACAAACAA	TGAGACACC	GGGGTTAGGT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM49II	GTACAAACAA	TGAGACACC	GGGGTTAGGT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM51I	GTRHAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM51II	GTAGAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM53I	GYACAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM53II	GTACCAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM54I	GTGTAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM54II	---	---	---	---	---
PM55I	GTATAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ACCAATACAA	TGTGCTTCCA
PM55II	GTATAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ACCAATACAA	TGTGCTTCCA
PM56I	GTATAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM56II	GTATAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM57I	GTATAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM57II	GTATAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAARTACAA	TGTGCTTCCA
PM60I	GTATAAACAA	TGAAACACC	GGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTACTTCCA
PM60II	GTATAAAYAA	TGAAACACC	GGATTAGAT	ATCAARTACAA	TGTACTTCCA
PM62I	GTACAAATAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM62II	GTACAAATAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM63I	GTATAAACAA	TGARACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM63II	GTATAAACAA	TGAAACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM65I	GTATAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM65II	GTATAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM67I	GTACAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA
PM67II	GTACAAACAA	TGAGACACC	GGGATTAGAT	ATCAGTACAA	TGTGCTTCCA

	250	251	252	253	254
H0B2	TGGATGATT	GTATGTAGGA	TCTGACTTAG	AAATAGGGCA	GCATAGAACA
PM011	TGGATGATT	GTATGTAGGA	TCTGACTTAG	AAATAGGGCA	ACATAGAACA
PM011I	TGGATGATT	GTATGTAGGA	TCTGACTTAG	AAATAGGGCA	ACATAGAACA
PM031	TGGATGATT	GTATGTAGGA	TCTGACTTAG	AAATAGGGCA	ACATAGAGCA
PM031I	TGGATGATT	GTATGTAGGA	TCTGATTTAG	AAATAGGACA	ACACAGAGCA
PM051	TGGATGATT	GTATGTAGGA	TCTGAYTTAG	AAATAGGACA	ACATAGAATA
PM051I	TGGATGATT	GTATGTAGGA	TCTGACTTAG	AAATAGAAC	ACATAGAATA
PM061	TGGATGATT	GTATATAGGA	TCTGACTTAG	AAATAGGGCA	GCATAGAACA
PM061I	TGGATGATT	GTATATAGGA	TCTGACTTAG	AAATAGGGCA	GCATAGAACA
PM081	TGGATGATT	GTATGTAGGA	TCTGACTTAG	AAATAGGGCA	GCATAGARCA
PM081I	TGGATGATT	GTATGTAGG	TCTGACTTAG	AAATAGGGCA	GCATAGAGCA
PM091	TGGATGATT	GTATGTAGGA	TCTGACTTAG	AAATAGGGCA	GCATAGAGAA
PM091I	TGGATGATT	GTATGTAGGA	TCTGACTTAG	AAATAGGGCA	GCATAGAGAA
PM101	TGGATGATT	GTATGTAGGA	TCTGACTTAG	AAATAGGCA	GCATAGAGCA
PM101I	TGGATGATT	GTATGTAGGA	TCTGACTTAG	AAATAGGGCA	GCATAGAGCA

PM44II	TGGATGATT	GTATGTAGGA	TCTGACTTAG	AAATAG---	
PM48I	TGGATGATT	GTATGTAGGA	TCTGACTTAG	AAATAGGRC	RCATAGAACA
PM48II	TGGATGATT	GTATGTAGGA	TCTGACTTAG	AAATAGGGCA	GCATAGAACA
PM49I	TGGATGATT	GTATGTAGGA	TCAGACTTAG	AGATAGGGCC	GCATAGAAT
PM49II	TGGATGATT	GTATGTAGGA	TCAGACTTAG	AGATAGGGCC	GCATAGAAT
PM51I	TGGATGATT	GTATGTAGGA	TCTGACTTAG	AAATAGGGCA	ACATAGARCA
PM51II	TGGATGATT	GTATGTAGGA	TCTGACTTAG	AAATAGGCCA	ACATAGARCA
PM53I	TGGATGATT	ATATGTAGGA	TCTGACTTAG	AAATAGGGCA	GCATAGAACA
PM53II	TGGATGATT	ATATGTAGGA	TCTGACTTAG	AAATAGGGCA	GCATAGAACA
PM54I	TGGATGATT	GYWTGTAGGG	TCTGACTTAG	AAATAGAGCA	GCATAGAAGA
PM54II	---	---	---	---	---
PM55I	TGGATGATT	ATATGTAGGA	TCTGACTTAG	AGATAAGGCA	ACATAGAGAA
PM55II	TGGATGATT	ATATGTAGGA	TCTGACTTAG	AGATAAGGCA	ACATAGAGAA
PM56I	TGGATGATT	GTATGTAGGA	TCTGACTTAG	AAATAAGTGA	ACATAGAGAA
PM56II	TGGATGATT	GTATGTAGGA	TCTGACTTAG	AAATAAGTGA	ACATAGAGAA

PM21II					
PM23I	AAAAATAGAGG	AACCTGAGAAA	ACATCTGTTG	CAGTGGGGAT	TTACCAACACC
PM23II	AAAAATAGAGG	AACCTGAGAAA	ACATCTGTTG	CAGTGGGGAT	TTACCAACACC
PM24I	AAAAATAGAGG	AACTAAGACA	ACATTTGCTG	AAGTGGGGAT	TAAACCACACC
PM24II	AAAAATAGAGG	AACTAAGACA	RCATTTGTTG	ABRTGGGGAT	TGACACACACC
PM25I	AAAAATARAGG	AACCTGAGACA	ACATCTGTTG	AAGTGGGGAT	TTACCAACACC
PM25II	AAAAATAGAGG	AACCTGAGACA	ACATCTGTTG	AAGTGGGGAT	TTACCAACACC
PM27I	AAAAATAGAGG	AACCTGAGACA	ACATCTGCTG	AAGTGGGGAT	TTACCAACACC
PM27II	AAAAATAGAGG	AACCTGAGACA	ACATCTGCTG	AGGTGGGGAT	TTACCAACACC
PM28I	AAAAATAGAGG	AACCTGAGACA	ACATTTGTTG	AGGTGGGGAT	TTACCAACACC
PM28II	AAAAATAGAGG	AACCTGAGACA	ACATTTGTTG	AGATGGGGAT	TTACCAACACC
PM29I	AAGATAGAGG	AACCTAAGACA	GCATCTGTTG	AAGTGGGGAT	TTACCAACACC
PM29II	AAGATAGAGG	AACCTAAGACA	GCATCTGTTG	AAGTGGGGAT	TTACCAACACC
PM30I	AAAAATAGAGG	AACCTAAGACA	GCATCTGTTT	AGGTGGGGAT	TGACACACACC
PM30II	AAAAATAGAGG	AACCTAAGACA	GCATCTGTTG	AGGTGGGGAT	TGACACACACC
PM31I	AAAAATAGAGG	AACCTAAGACA	ACATCTGTTG	AAGTGGGGAT	TTACCAACACC
PM31II	AAAAATAGAGG	AACCTAAGACA	ACATCTGTTG	AAGTGGGGAT	TTACCAACACC
PM32I	AAGGTAGAGG	AACCTGAGACA	ACATCTGCTT	AAGTGGGGAT	TTACCAACACC
PM32II	AAGGTAGAGG	AACCTGAGACA	ACATCTGCTG	AGGTGGGGAT	TTACCAACACC
PM33I	AAAAATAGAGG	AAGTTGAGGCA	ACATTTGCTG	AGGTGGGGAT	TTACCAACACC
PM33II	AAAAATAAGG	AATTTGAGGCA	ACATTTGCTG	AGGTAAAGAT	TTACCAACACC

	960	970	980	990	1000
HCB2	AGACAAAAAA	CATCAGAAAG	AACCTCCATT	CCITTTGGATG	G6TTATGAAC
PM01I	AGACCAGAAA	CATCAGAAAG	AACCTCCATT	CCITTTGGATG	G6TTATGAAC
PM01II	AGACCAGAAA	CATCAGAAAG	AACCTCCATT	CCITTTGGATG	G6TTATGAAC
PM03I	AGACAAAAAA	CATCAGAAAG	AACCTCCATT	CCITTTGGATG	G6TTATGAAC
PM03II	AGACAAAAAA	CATCAGAAAG	AACCTCCATT	CCITTTGGATG	G6TTATGAAC
PM05I	AGACAAAAAA	CATCAGAAAG	AACCTCCATT	CCITTTGGATG	G6TTATGAAC
PM05II	AGACAAAAAA	CATCAGAAAG	AACCTCCATT	CCITTTGGATG	G6TTATGAAC
PM06I	AGACAAAAAA	CATCAGAAAG	AACCTCCATT	CCITTTGGATG	G6TTATGAAC
PM06II	AGACAAAAAA	CATCAGAAAG	AACCTCCATT	CCITTTGGATG	G6TTATGAAC
PM08I	AGACAAAAAA	CATCAGAAAG	AACCTCCATT	CCITTTGGATG	G6TTATGAAC
PM08II	AGACAAAAAA	CATCAGAAAG	AACCTCCATT	CCITTTGGATG	G6TTATGAAC
PM09I	AGACAAAAAA	CATCAGAAAG	AACCTCCATT	CCITTTGGATG	G6TTATGAAC
PM09II	AGACAAAAAA	CATCAGAAAG	AACCTCCATT	CCITTTGGATG	G6TTATGAAC
PM10I	AGACAAAAAA	CATCAGAAAG	AACCTCCATT	CCITTTGGATG	G6TTATGAAC
PM10II	AGACAAAAAA	CATCAGAAAG	AACCTCCATT	CCITTTGGATG	G6TTATGAAC
PM11I	AGACAAAAAA	CATCAGAAAG	AACCTCCATT	CCITTTGGATG	G6TTATGAAC
PM11II	AGACAAAAAA	CATCAGAAAG	AACCTCCATT	CCITTTGGATG	G6TTATGAAC
PM12I	AGACAAAAAA	CATCAGAAAG	AACCTCCATT	CCITTTGGATG	G6TTATGAAC
PM12II	AGACAAAAAA	CATCAGAAAG	AACCTCCATT	CCITTTGGATG	G6TTATGAAC
PM13I	AGACAAAAAA	CATCAGAAAG	AACCTCCATT	CCITTTGGATG	G6TTATGAAC
PM13II	AGACAAAAAA	CATCAGAAAG	AACCTCCATT	CCITTTGGATG	G6TTATGAAC

PM38I	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAACTGCTGCC	AGAAAAGAGC
PM38II	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAACTGCTGCC	AGAAAAGAGC
PM39I	TTTATCCTGA	CAAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAGTGCTGCC	AGAAAAGAGC
PM39II	TTTATCCTGA	CAAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAGTGCTGCC	AGAAAAGAGC
PM40I	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAAAATCTACC	AGAAAAGAGC
PM40II	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAAAATCTACC	AGAAAAGAGC
PM43I	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAGTGCTGCC	AGAAAAGAGC
PM43II	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAGTGCTGCC	AGAAAAGAGC
PM44I	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAGTGCTGCC	AGAAAAGAGC
PM44II	-----	-----	-----	-----	-----
PM48I	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAAAGCTGCC	AGAAAAGAGC
PM48II	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAAAGCTGCC	AGAAAAGAGC
PM49I	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAGTGCTGCC	AGAAAAGAGC
PM49II	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAGTGCTGCC	AGAAAAGAGC
PM51I	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAAATGCTGCC	AGAAAAGAGC
PM51II	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAAATGCTGCC	AGAAAAGAGC
PM53I	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAAAATCTGCC	AGAAAAGAGC
PM53II	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAAAATCTGCC	AGAAAAGAGC
PM54I	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAAWGCTGCC	AGAAAAGAGC
PM54II	-----	-----	-----	-----	-----
PM55I	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCTTA	TAGTGCTGCC	AGAAAAGAGC
PM55II	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCTTA	TAGTGCTGCC	AGAAAAGAGC
PM56I	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTGACGCTTA	TAAATGCTGCC	AGAAAAGAGC
PM56II	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAAATGCTGCC	AGAAAAGAGC
PM57I	TCCATCCTGA	CAAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAGACTGCC	AGAAAAGAGC
PM57II	TCCATCCTGA	CAAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAGACTGCC	AGAAAAGAGC
PM60I	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAGTGCTACC	AGAAAAGAGC
PM60II	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAGTGCTACC	AGAAAAGAGC
PM62I	TTTATCCTGA	CAAAATGGACA	GTCCAGCCTA	TACAGCTGCC	AGAAAAGAGC
PM62II	TTTATCCTGA	CAAAATGGACA	-TCCAGCCTA	TACAGCTGCC	AGAAAAGAGC
PM63I	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAAATGCTGCC	AGAAAAGAGC
PM63II	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAAATGCTGCC	AGAAAAGAGC
PM65I	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAGTGTGCC	AGAAAAGAGC
PM65II	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAGTGTGCC	AGAAAAGAGC
PM67I	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAAATTTGCC	AGAAAAGAGC
PM67II	TCCATCCTGA	TAAATGGACA	GTACAGCCTA	TAAATTTGCC	AGAAAAGAGC

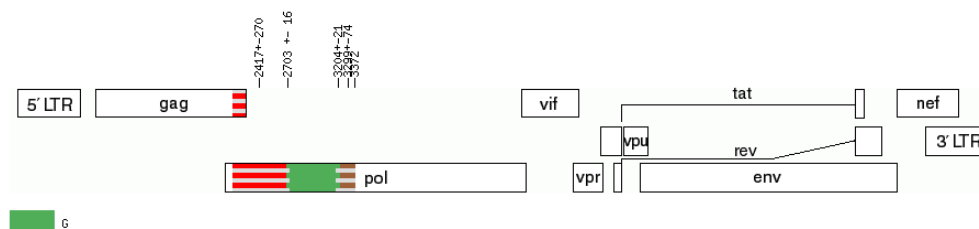
	1060	1070	1080	1090
H5CB2	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAAGTTA	GTGGGGAAAAT
PM011I	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAAGTTA	GTGGGGAAAAT
PM011II	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAAGTTA	GTGGGGAAAAT
PM033I	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAAGTTA	GTGGGGAAAAT
PM033II	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAAGTTA	GTGGGGAAAAT
PM051I	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAAGTTA	GTGGGGAAAAT
PM051II	AGCTAGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAATTA	GTAGGAAAAGT
PM061I	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAATTA	GTGGGGAAAAT
PM061II	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAATTA	GTGGGGAAAAT
PM081I	ATCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAAGTTA	GTGGGGAAAAT
PM081II	ATCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAATTA	GTGGGGAAAAT
PM091I	AGCTGGACT-			
PM091II	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAAGTTA	GTGGGGAAAAT
PM101I	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAAGTTA	GTGGGGAAAAT
PM101II	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAAGTTA	GTGGGGAAAAT
PM111I	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAAGTTA	GTGGGGAAAAT
PM111II	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAAGTTA	GTGGGGAAAAT
PM121I	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAAGTTA	GTGGGGAAAAT
PM121II	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAAGTTA	GTGGGGAAAAT
PM131I	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAAGTTA	GTGGGGAAAAT
PM131II	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAAGTTA	GTGGGGAAAAT
PM151I	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAAGTTA	GTGGGGAAAAT
PM151II	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAAGTTA	GTGGGGAAAAT
PM171I	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAAGTTA	GTGGGGAAAAT
PM171II	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAAGTTA	GTGGGGAAAAT
PM191I	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAAGTTA	GTGGGGAAAAT
PM191II	AGCTGGACTG	TCAATGACAT	ACAGAAAGTTA	GTGGGGAAAAT

Anexo 10. Sensibilidad de los programas utilizados para la detección de recombinación genética del VIH-1 en ambos tiempos.

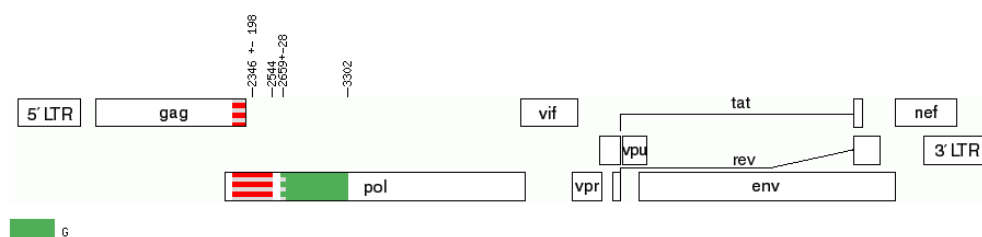
Programas	Primer Tiempo		Segundo Tiempo	
	<i>Pol</i> (%)	<i>Gag</i> (%)	<i>Pol</i> (%)	<i>Gag</i> (%)
COMET HIV-1v2.2	100.0	100.0	100.0	100.0
REGAv3.0	100.0	82.6	100.0	82.6
jpHMM	100.0	97.8	100.0	95.7
RIP v3.0	100.0	100.0	100.0	97.8

Anexo 11. Eventos recombinantes del VIH-1 de la población militar.

A

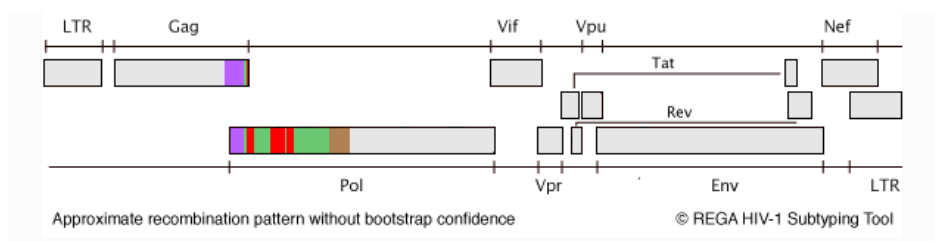


B

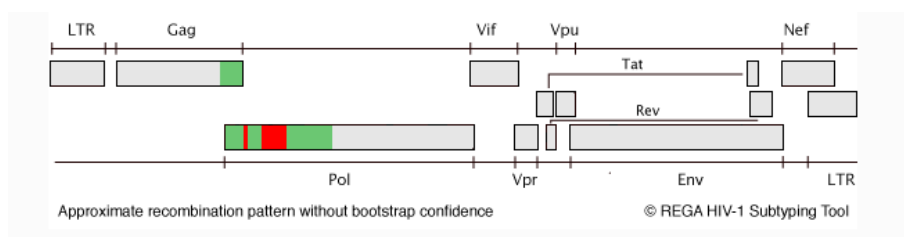


Anexo 11A y 11B. Eventos recombinantes por la plataforma jpHMM HIV-1 (fragmento del gen *Pol*)
A) Tipo de recombinación A1/C/G del participante PM062 en el primer tiempo. A1= Rojo; G= Verde; C= Marrón. **B)** Tipo de recombinación A1/G del participante PM062 del segundo tiempo. A1= Rojo; G= Verde.

C

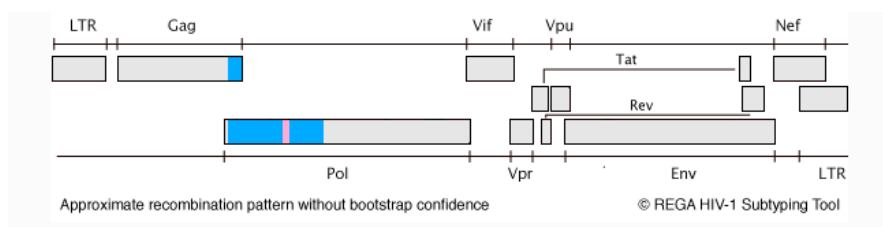


D

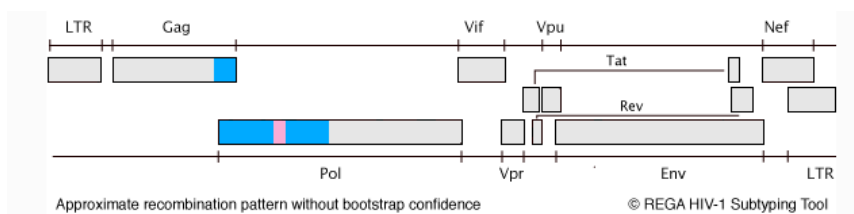


Anexo 11C y 11D. Eventos recombinantes por la plataforma REGA HIV-1(fragmento del gen *Pol*) **C)** Tipo de recombinación CRF02_AG del participante PM062 en el primer tiempo. **D)** Tipo de recombinación CRF02_AG del participante PM062 en el segundo tiempo.

E

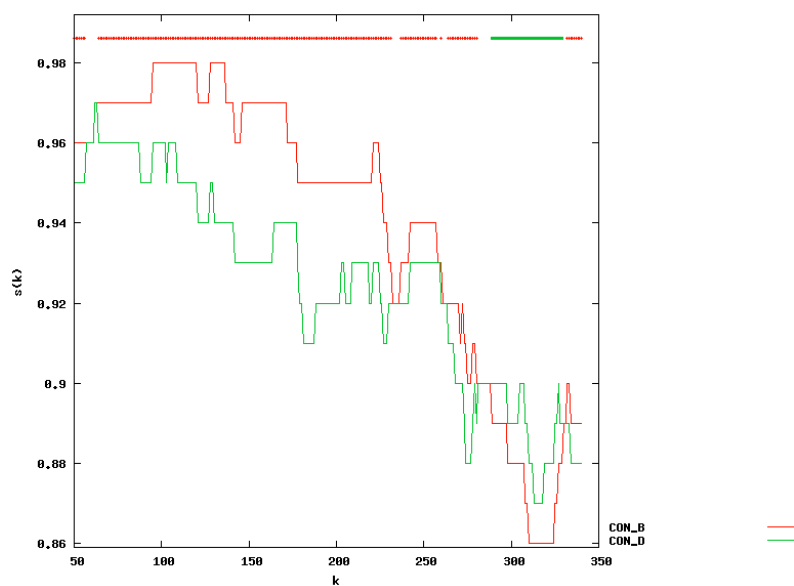


F



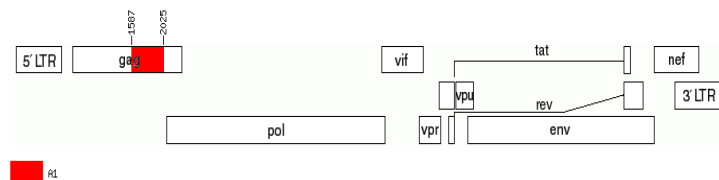
Anexo 11E y 11F. Eventos recombinantes por la plataforma REGA HIV-1(fragmento del gen *Pol*) **E)** Tipo de recombinación B/D del participante PM010 en el primer tiempo. B= Celeste; D= Rosado **F)** Tipo de recombinación B/D del participante PM024 en el segundo tiempo. B= Celeste; D= Rosado.

G



Anexo 11G. Evento recombinante (Plot) B/D en el participante PM043 del segundo tiempo por la plataforma RIP HIV-1(fragmento del gen *Pol*). B= Rojo; D= Verde.

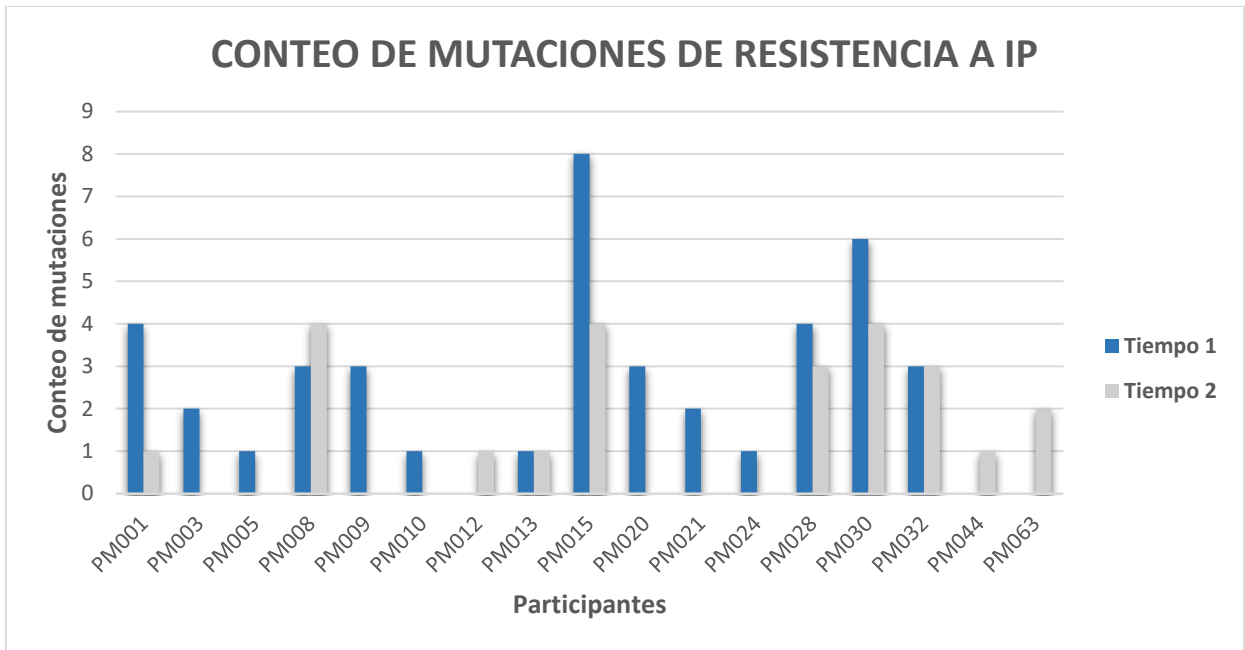
H



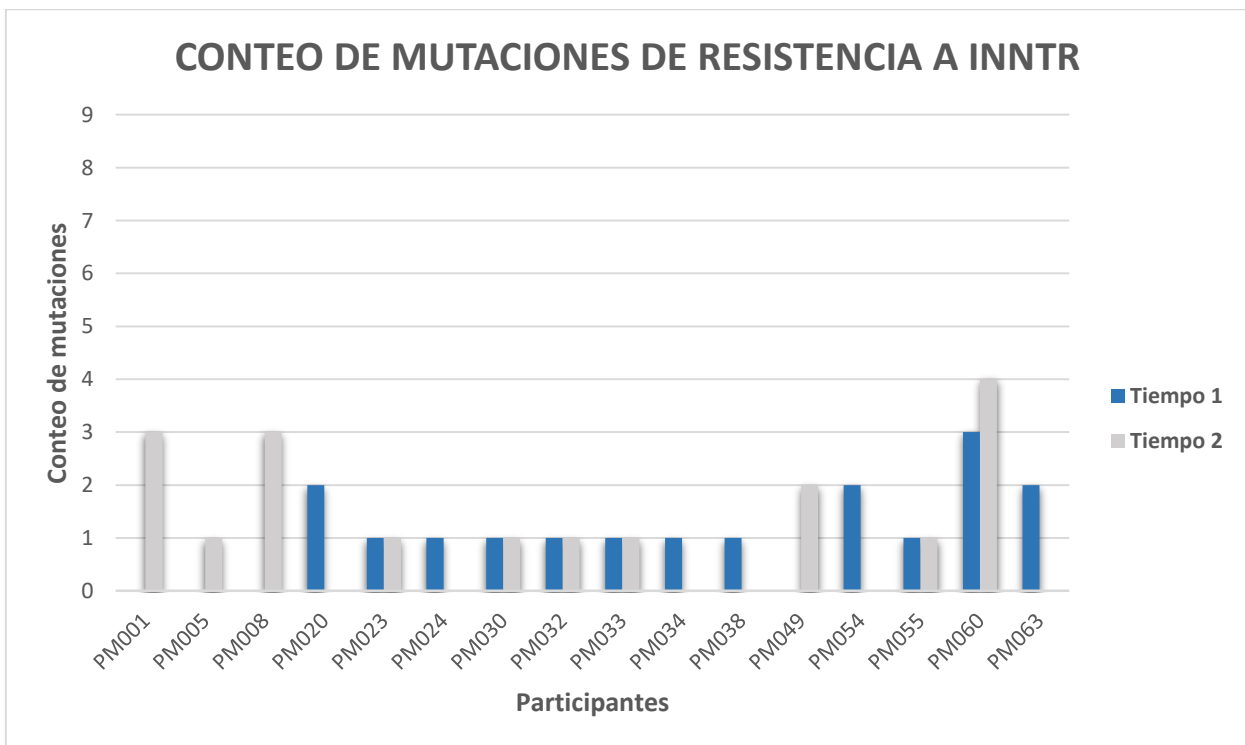
Anexo 11H. Evento recombinante por la plataforma jpHMM HIV-1 (fragmento del gen *Gag*) Fragmento de la porción p24 – p7 del gen *Gag*, Subtipo A1 = Rojo.

Anexo 12. Conteo de mutaciones de resistencia por grupo inhibidor en el personal militar.

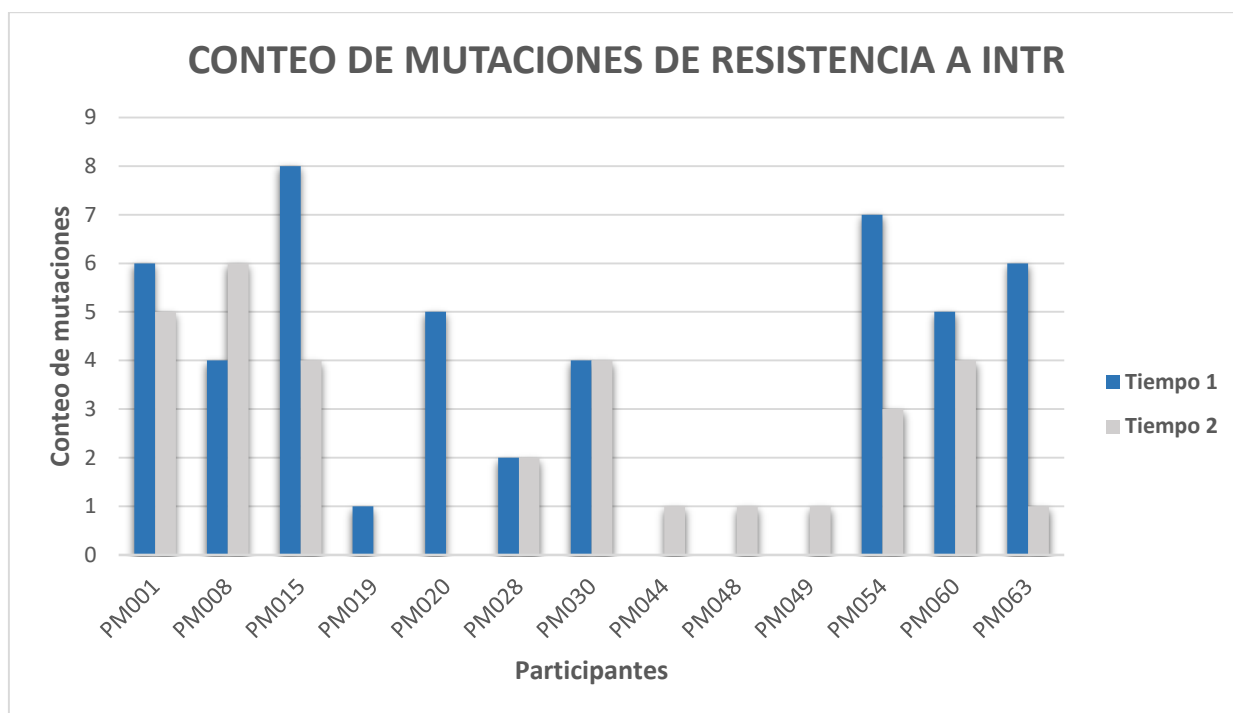
A



B



C



Anexo 12. **A)** Conteo de mutaciones de resistencia del VIH-1 a Inhibidores de la Proteasa en el personal militar en ambos tiempos. **B)** Conteo de mutaciones de resistencia del VIH-1 a Inhibidores no nucleósidos de la Transcriptasa Reversa en el personal militar en ambos tiempos. **C)** Conteo de mutaciones de resistencia del VIH-1 a Inhibidores nucleósidos de la Transcriptasa Reversa en el personal militar en ambos tiempos.

Anexo 13. Recuento linfocitario y carga viral del VIH-1 de la población militar.

Paciente (código asignado)	Diferencia de tiempo (Años, meses)	Primer tiempo		Segundo tiempo	
		Recuento CD4 (células/mL)	Carga viral (copias/mL)	Recuento CD4 (células/mL)	Carga viral (copias/mL)
PM001	1 año, 3 meses	816	<40*	1048	<40*
PM002	1 año, 3 meses	343	Target Not Detected	567	<40*
PM003	1 año, 5 meses	415	ND	476	<20**
PM005	1 año, 5 meses	874	Muestra rechazada	954	<20**
PM006	1 año, 1 mes	795	Target Not Detected	1363	Target Not Detected
PM007	1 año, 1 mes	666	Target Not Detected	611	Target Not Detected
PM008	1 año, 1 mes	593	Target Not Detected	733	Target Not Detected
PM009	1 año, 1 mes	473	Target Not Detected	467	Target Not Detected
PM010	1 año, 4 meses	319	<40*	310	79.3
PM011	1 año, 4 meses	501	2013	678	Target Not Detected
PM012	1 año	1010,5	Target Not Detected	1215	<20**
PM013	1 año	363	Target Not Detected	486	<40*
PM015	1 año, 5 meses	492,43	Target Not Detected	573	<20**
PM016	1 año, 1 mes	751	Target Not Detected	967	Target Not detected
PM017	1 año, 7 meses	632	279	588	<20**
PM019	1 año	683,65	<40*	617	Target Not Detected
PM020	2 años, 8 meses	373	Target Not Detected	266	Target Not Detected
PM021	1 año, 2 meses	785,75	Target Not Detected	1000	Target Not Detected
PM023	1 año	352	Target Not Detected	366	Target Not Detected
PM024	1 año	434	Target Not Detected	429	Target Not Detected
PM025	1 año, 2 meses	39	Target Not Detected	271	Target Not Detected
PM027	2 años, 6 meses	891	Target Not Detected	1003	Target Not Detected
PM028	1 año, 1 mes	333	Target Not Detected	464	85
PM029	7 meses	415	Target Not Detected	455	Target Not detected
PM030	1 año, 2 meses	504	Target Not Detected	566	<20**
PM031	1 año, 6 meses	931	<40*	758	<20**
PM032	1 año, 10 meses	604	Target Not Detected	604	Target Not Detected
PM033	6 meses	878	Target Not Detected	878	Target Not Detected
PM034	1 año, 7 meses	320	61	333	2350
PM035	2 años, 7 meses	209	Target Not Detected	393	Target Not Detected
PM037	1 año, 3 meses	238	Target Not Detected	310	Target Not Detected
PM038	2 años, 1 mes	252	8740		267000
PM039	1 año, 2 meses	436	722	571	<20**
PM040	1 año, 3 meses	907	Target Not Detected		<20**
PM042	1 año, 5 meses	397	Target Not Detected	347	Target Not Detected
PM043	1 año, 5 meses	664	Target Not Detected	413	Target Not Detected
PM044	1 año, 6 meses	403	Target Not Detected	445	Target Not Detected
PM047	1 año, 9 meses	757	Target Not Detected		Target Not Detected
PM048	1 año, 2 meses	509	Target Not Detected		<20**

PM049	1 año, 5 meses	320	2840	287	3970
PM051	1 año, 5 meses	635	Target Not Detected	589	Target Not Detected
PM053	1 año	594	58,8	698	<40*
PM054	1 año, 5 meses	665	491	498	<40*
PM055	11 meses	340	Target Not Detected	369	<20**
PM056	1 año	552	Target Not Detected	523	Target Not Detected
PM057	1 año, 5 meses	518	Target Not Detected	537	<20**
PM060	1 año	177	178000	350	155
PM061	1 año, 3 meses	1115	Target Not Detected	976	Target Not Detected
PM062	1 año, 3 meses	795	Target Not Detected	858	<20**
PM063	1 año, 3 meses	207	Target Not Detected	335	Target Not Detected
PM065	1 año, 3 meses	711	Target Not Detected	854	Target Not Detected
PM067	6 meses	534	2120	616	<20**

*: Límite detectable de carga viral del VIH-1 (copias/mL) por el equipo Abbot m2000 durante el período 2015 – 2016.

** : Límite detectable de carga viral del VIH-1 (copias/mL) por el equipo Cobas 6800 durante el período 2017 hasta la actualidad.

Anexo 14. Prueba de tasa relativa de Tajima para el gen *pol* del VIH-1 en ambos tiempos.

POBLACIÓN MILITAR	POL						
	PRIMER TIEMPO	SEGUNDO TIEMPO	GRUPO EXTERNO (HXB2)	DIVERGENCIA	SITIOS IDENTICOS	χ^2	P
PM001	0	1	26	0	1021	1.00	0.31731
PM003	0	8	39	0	1030	8.00	0.00468
PM005	0	31	40	0	1005	31.00	0.00000
PM006	0	0	53	0	1034	0.00	1.00000
PM008	0	5	23	0	991	5.00	0.02535
PM009	0	0	44	0	992	0.00	1.00000
PM010	1	0	36	0	1019	1.00	0.31731
PM011	0	1	32	0	1052	1.00	0.31731
PM012	2	1	17	0	1050	0.33	0.56370
PM013	0	0	22	0	1033	0.00	1.00000
PM015	0	5	28	0	1004	5.00	0.02535
PM017	9	6	36	1	1018	0.60	0.43858
PM019	2	7	21	0	1016	2.78	0.09558
PM020	2	0	36	0	980	2.00	0.15730
PM021	4	15	25	0	719	6.37	0.01162
PM023	0	1	34	0	1037	1.00	0.31731
PM024	4	2	37	1	1014	0.67	0.41422
PM025	0	0	44	0	1042	0.00	1.00000
PM027	4	2	33	0	972	0.67	0.41422
PM028	6	14	38	0	1034	3.20	0.07364
PM029	0	0	46	0	1040	0.00	1.00000
PM030	0	2	28	0	1027	2.00	0.15730
PM031	0	1	39	0	1040	1.00	0.31731
PM032	3	2	41	0	902	0.20	0.65472
PM033	1	44	44	0	1002	41.09	0.00000
PM034	8	2	30	1	931	3.60	0.05778
PM035	0	3	41	0	1034	3.00	0.08326
PM037	0	0	45	0	1034	0.00	1.00000
PM038	2	4	35	0	1003	0.67	0.41422
PM039	1	1	33	0	1031	0.00	1.00000
PM040	1	0	31	0	1051	1.00	0.31731
PM043	1	1	41	0	1044	0.00	1.00000
PM044	3	23	28	1	826	15.38	0.00009
PM048	1	2	19	0	1041	0.33	0.56370
PM049	0	1	47	0	1031	1.00	0.31731
PM051	0	1	20	0	1042	1.00	0.31731

PM053	0	2	37	0	1034	2.00	0.15730
PM054	0	0	15	0	599	0.00	1.00000
PM055	0	0	49	0	1040	0.00	1.00000
PM056	3	5	40	0	1044	0.50	0.47950
PM057	3	1	36	0	1009	1.00	0.31731
PM060	0	3	53	0	1018	3.00	0.08326
PM062	0	0	83	0	875	0.00	1.00000
PM063	1	4	29	1	1032	1.80	0.17971
PM065	2	0	27	0	1060	2.00	0.15730
PM067	0	0	28	0	1005	0.00	1.00000

Anexo 15. Prueba de tasa relativa de Tajima para el gen *gag* del VIH-1 en ambos tiempos.

POBLACIÓN MILITAR	GAG						
	PRIMER TIEMPO	SEGUNDO TIEMPO	GRUPO EXTERNO (HXB2)	DIVERGENCIA	SITIOS IDENTICOS	X ²	P
PM001	3	4	11	0	380	0.14	0.70546
PM003	2	1	20	0	262	0.33	0.56370
PM005	0	0	17	0	383	0.00	1.00000
PM006	0	0	32	0	375	0.00	1.00000
PM008	5	16	21	0	366	5.76	0.01638
PM009	0	0	32	0	376	0.00	1.00000
PM010	0	2	8	0	247	2.00	0.15730
PM011	0	5	13	0	390	5.00	0.02535
PM012	0	1	15	0	391	1.00	0.31731
PM013	1	4	12	0	380	1.80	0.17971
PM015	0	2	19	0	385	2.00	0.15730
PM017	4	6	26	0	369	0.40	0.52709
PM019	4	3	13	0	301	0.14	0.70546
PM020	3	1	25	1	376	1.00	0.31731
PM021	3	1	11	0	251	1.00	0.31731
PM023	1	2	16	1	380	0.33	0.56370
PM024	2	2	25	0	373	0.00	1.00000
PM025	0	0	26	0	379	0.00	1.00000
PM027	3	2	18	0	383	0.20	0.65472
PM028	7	4	13	0	381	0.82	0.36571
PM029	0	0	31	0	286	0.00	1.00000
PM030	0	2	19	0	387	2.00	0.15730
PM031	0	0	24	0	328	0.00	1.00000
PM032	4	2	20	0	364	0.67	0.41422
PM033	0	0	30	0	378	0.00	1.00000
PM034	2	3	13	0	268	0.20	0.65472
PM035	3	3	18	0	384	0.00	1.00000
PM037	0	3	28	1	376	3.00	0.08326
PM038	2	2	18	1	347	0.00	1.00000
PM039	3	3	26	0	375	0.00	1.00000
PM040	2	17	21	0	358	11.84	0.00058
PM043	7	3	21	0	345	1.60	0.20590
PM044	0	0	22	0	386	0.00	1.00000
PM048	4	1	14	0	378	1.80	0.17971
PM049	0	0	27	0	367	0.00	1.00000
PM051	7	1	19	0	381	4.50	0.03389
PM053	1	0	22	0	379	1.00	0.31731

PM054	3	2	22	1	379	0.20	0.65472
PM055	3	1	12	0	361	1.00	0.31731
PM056	2	10	20	0	331	5.33	0.02092
PM057	4	0	21	0	383	4.00	0.04550
PM060	0	1	28	0	370	1.00	0.31731
PM062	1	0	48	0	350	1.00	0.31731
PM063	1	3	16	0	385	1.00	0.31731
PM065	4	2	16	0	350	0.67	0.41422
PM067	8	4	18	2	376	1.33	0.24821