

ARTÍCULO ORIGINAL

Optimización de recursos para determinar la carga viral de HIV-1 en un país con pocos recursos

Amalia Girón-Callejas^{1,2}, Ricardo Mendizábal-Burastero^{1,2}, Elizabeth Yax¹, Axel Martínez¹, Carlos Mejía-Villatoro^{1†}

¹ Clínica de Enfermedades Infecciosas, Hospital Roosevelt, Ciudad de Guatemala, Guatemala

² Universidad del Valle de Guatemala, Ciudad de Guatemala, Guatemala

Introducción. Las metas globales para controlar la epidemia de HIV contemplan que la carga viral sea indetectable en 90 % de las personas en tratamiento. El costo de la medición de la carga viral en lotes de muestras puede reducirse y, así, aumentar la cobertura cuando los recursos son limitados; sin embargo, su eficacia disminuye al aumentar la prevalencia del fracaso del tratamiento antirretroviral.

Objetivo. Evaluar estrategias para disminuir la proporción de pacientes con fracaso del tratamiento antirretroviral en los lotes de muestras y, de esta manera, aumentar el ahorro en las pruebas de carga viral.

Materiales y métodos. Las estrategias evaluadas fueron: a) la organización de los lotes de muestras según el esquema de tratamiento antirretroviral, y b) la exclusión de aquellos pacientes con antecedente reciente de fracaso del tratamiento antirretroviral, aquellos con menos de 12 meses de tratamiento antirretroviral y aquellos sin tratamiento antirretroviral previo. Los resultados de los lotes se compararon con los resultados individuales.

Resultados. El valor diagnóstico negativo fue similar para los pacientes con esquema de primera línea (100,0 %; IC_{95%} 99,5-100,0) o de segunda línea de tratamiento (99,4 %; IC_{95%} 96,9-99,9). La incidencia del fracaso del tratamiento antirretroviral fue menor en los pacientes con tratamiento de primera línea ($p < 0,01$), lo cual permitió un mayor ahorro en las pruebas de laboratorio en este grupo (74,0 %; IC_{95%} 71,0-76,7) que en los pacientes con tratamiento de segunda línea (50,9 %; IC_{95%} 44,4-57,3) ($p < 0,01$).

Conclusión. La selección de las muestras que se incluyeron en los lotes para determinar la carga viral del HIV según el tipo de esquema de tratamiento, permitió maximizar el porcentaje de ahorro en pruebas de laboratorio.

Palabras clave: HIV; carga viral; ahorro de costo; análisis costo-eficiencia; estrategias.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3318>

Optimizing resources to reduce costs to determine HIV viral load in limited resources settings

Introduction: HIV viral load testing is a key factor to evaluate the accomplishment of the UNAIDS target of 90% of viral suppression among people receiving antiretroviral therapy. Pooled samples are a potentially accurate and economic approach in resource-constrained settings, but efficiency can be negatively affected by high prevalence rates of virological failure.

Objective: Strategies were assessed to increase the relative efficiency of pooled HIV viral load testing in resource-constrained settings.

Materials and methods: We evaluated two strategies: a) plasma samples were not included in pools if patients had <12 months on antiretroviral therapy, patients had previous viral load >1,000 copies/ml, or were antiretroviral therapy naïve patients, and b) plasma pools were organized separately for first and second-line antiretroviral therapy regimens. Individual viral load tests were used to compare pooled results.

Results: Negative predictive values were similar for patients on first (100.0%; 95% CI 99.5 to 100.0) and second-line antiretroviral therapy regimens (99.4%; 95% CI 96.9 to 99.9). However, the incidence of virological failure among individuals on first-line antiretroviral therapy was lower than second-line antiretroviral therapy patients ($p < 0.01$), resulting in greater savings in laboratory tests in patients on first-line antiretroviral therapy (74.0%; 95% CI 71.0 to 76.7) compared with the group of patients on second-line antiretroviral therapy (50.9%; 95% CI 44.4 to 57.3) ($p < 0.01$).

Contribución de los autores:

Carlos Mejía-Villatoro: diseño del estudio

Elizabeth Yax y Axel Martínez: fase experimental y análisis de datos

Amalia Girón-Callejas y Ricardo Mendizábal-Burastero participaron en todas las etapas del estudio.

Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

Conclusion: Selecting the samples to be included in the pools and selecting the pools according to ART regimens are criteria that could lead to decreased spending on laboratory tests for HIV viral load determination in resource-constrained settings.

Key words: HIV; viral load; cost savings; cost efficiency analysis; strategies.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3318>

La medición de la carga viral plasmática del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) es la herramienta empleada para evaluar la efectividad del tratamiento antirretroviral, el cual busca suprimir la replicación del virus (1). Una prueba de laboratorio comúnmente usada para determinar la carga viral es la cuantificación del ARN plasmático del HIV mediante la transcripción inversa del genoma viral y, posteriormente, la reacción en cadena de la polimerasa (*reverse transcription Polymerase Chain Reaction*, rt-PCR) en tiempo real. Se considera que ha habido fracaso del tratamiento antirretroviral cuando no es efectivo para suprimir la replicación viral, lo cual se establece cuando, en dos ocasiones y con un mes de diferencia como mínimo, la carga viral es mayor de 1.000 copias de ARN por ml de plasma (1).

La carga viral es, entonces, un estándar de la atención en salud que reciben los pacientes infectados con HIV. Es más, las nuevas metas de control de la epidemia de HIV para el año 2020, propuestas por el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el HIV/sida (ONUSIDA), contemplan que la carga viral debe ser indetectable en el 90 % de las personas con tratamiento antirretroviral (2). Sin embargo, en los países en desarrollo, el acceso a esta prueba de laboratorio puede dificultarse debido a su costo (3). Tal es el caso de Guatemala, en donde se ha estimado que los pacientes son sometidos a la prueba de carga viral 1,2 veces al año, en lugar de las dos mediciones recomendadas por el protocolo nacional (4).

La medición de la carga viral de HIV mediante el análisis de las muestras plasmáticas en lotes, se considera una estrategia que reduce los costos relacionados con el control de la efectividad del tratamiento antirretroviral (5,6). Sin embargo, la eficacia de esta estrategia disminuye cuando aumenta la prevalencia de fracaso del tratamiento antirretroviral en la población (7).

El objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad de la estrategia de analizar lotes de muestras organizadas en una matriz para medir la carga viral de HIV después de excluir las muestras de pacientes con antecedente reciente de fracaso del tratamiento antirretroviral, aquellos con menos de 12 meses de estar recibiendo tratamiento antirretroviral y los que no lo habían recibido previamente. Además, se organizaron lotes de muestras según el esquema de tratamiento antirretroviral, asumiendo que, de tener una prevalencia de fracaso del tratamiento antirretroviral diferente según el esquema de tratamiento, la eficiencia de la estrategia se diferenciaría igualmente.

Materiales y métodos

Se obtuvo la aprobación del Comité de Ética del Hospital Roosevelt para hacer el estudio en individuos mayores de 18 años en este centro, que atiende a la cohorte más grande de pacientes con HIV bajo tratamiento antirretroviral en Guatemala.

En este estudio no se solicitó el consentimiento informado de los pacientes, ya que las pruebas de carga viral son un servicio que se ofrece regularmente en Guatemala a los pacientes con HIV, y la comparación de las metodologías de laboratorio se hizo con muestras sin identificación personal de los pacientes. A los pacientes se les entregó el resultado de la carga viral determinado por la medición individual de cada muestra de plasma.

Selección de las muestras

Se incluyeron solamente aquellos pacientes que habían recibido el tratamiento antirretroviral, por lo menos, durante 12 meses, para contar con, al menos, una carga viral previa, lo cual fue uno de los criterios de inclusión.

Con el propósito de optimizar la eficacia de la estrategia de determinación de la carga viral por lotes de muestras, se excluyó a los pacientes con antecedente reciente de fracaso del tratamiento antirretroviral; estos pacientes se detectaron mediante la revisión de la base de datos de registro de los resultados de carga viral, usando como criterio de exclusión un último resultado de carga viral de ARN mayor de 1.000 copias/ml.

Correspondencia:

Ricardo Mendizábal-Burastero, Hospital Roosevelt, Clínica de Enfermedades Infecciosas, zona 11, Ciudad de Guatemala, Guatemala

Teléfono: (502) 2497 7300; fax: (502) 2445 4304
rmendizabalb@gmail.com

Recibido: 25/04/16; aceptado: 07/12/16

Las muestras se recolectaron de manera consecutiva, con el fin de simular el flujo de trabajo de la clínica. Se seleccionaron 800 muestras de pacientes tratados con el esquema de tratamiento antirretroviral de primera línea (dos inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa y un inhibidor no nucleósido de la transcriptasa inversa) y 198 tratados con el esquema de segunda línea (dos inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa y un inhibidor de la proteasa).

Las 998 muestras representaron el 33 % de la cohorte de pacientes en tratamiento en la clínica. El tamaño de la muestra de cada grupo (primera línea y segunda línea) correspondió a la proporción de pacientes que recibía cada tipo de tratamiento.

Toma y manejo de las muestras

Se extrajeron 5 ml de sangre venosa en un tubo con anticoagulante con EDTA; la muestra se centrifugó a 20 °C durante 20 minutos a 568g antes de que se cumplieran seis horas de haberla tomado. Se separó el plasma y se almacenó a -20 °C hasta el momento de ser analizado.

Organización de las muestras en lotes

Se usó la estrategia de analizar las muestras en lotes, es decir, muestras mezcladas en cantidades iguales y analizadas como una unidad. Los lotes se organizaron, se analizaron y se interpretaron mediante la estrategia de matriz descrita previamente (7), es decir, por columnas y filas, de manera que cada muestra quedó incluida en dos lotes, uno correspondiente a la columna y otro a la fila.

Al encontrar lotes con resultados superiores al punto de corte, se procesaba individualmente la muestra que coincidía con la intersección entre las filas y las columnas para identificar dentro del lote la muestra con alta carga viral (7).

Las muestras se separaron según el esquema de tratamiento antirretroviral que recibía el paciente. Las de aquellos tratados con el esquema de primera línea de antirretrovirales, se organizaron en lotes de diez analizados luego en matrices de diez por diez. En el caso de las muestras de pacientes que recibían el esquema de segunda línea, estas se analizaron en lotes de cinco muestras, organizados en una matriz de cinco por cinco.

La disminución del tamaño del lote de diez a cinco muestras permitió que la estrategia de análisis de la carga viral por lotes se aplicara a una población pequeña de pacientes que recibían el segundo esquema de antirretrovirales, analizando al menos una matriz al mes.

Con el fin de detectar las muestras con una carga viral de ARN mayor de 1.000 copias/ml, parámetro definido como fracaso del tratamiento antirretroviral por el protocolo de país (1), se utilizaron como puntos de corte los resultados de la carga viral de ARN mayor de 100 o 200 copias/ml para los lotes de diez y cinco muestras, respectivamente. El punto de corte se estableció dividiendo el valor por detectar, en este caso 1.000 copias/ml, entre el número de muestras que conformaban el lote, es decir, diez o cinco.

Medición de la carga viral de HIV

Se midió la carga viral de HIV por medio de rt-PCR en tiempo real, usando la prueba COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1®, versión 2,0 (Roche, Alameda, California), según las instrucciones del fabricante.

Análisis de los datos

El desempeño de la estrategia de análisis de lotes de muestras organizados en una matriz, se comparó con la medición individual de la carga viral de HIV. El valor diagnóstico negativo se estimó usando la función de evaluación de una prueba diagnóstica del programa OpenEpi, versión 3.0.3. La eficacia relativa se estimó como la proporción de ahorro del número de pruebas de laboratorio que debían hacerse. Este mismo programa se usó para estimar la incidencia del fracaso del tratamiento antirretroviral. Con base en el registro de las horas requeridas para determinar la carga viral, se calculó el porcentaje de ahorro en el tiempo empleado, comparando las determinaciones individuales y el análisis por lotes de las muestras.

Resultados

De los 998 pacientes cuyas muestras se recolectaron, 55,8 % correspondió al sexo masculino, 42,2 % al femenino y 2,0 % a personas transgénero. La mediana de meses de estar recibiendo el tratamiento fue de 39 (rango intercuartílico: 24-49) y 18 (rango intercuartílico: 16-24) para los pacientes con esquema de primera y segunda línea de tratamiento antirretroviral, respectivamente (cuadro 1). La incidencia de fracaso del tratamiento antirretroviral fue significativamente menor ($p < 0,01$) en los pacientes con prescripción de tratamiento antirretroviral de primera línea que en quienes recibían el esquema de segunda línea (0,9 %; IC_{95%} 0,4-1,8 y 8,6 %; IC_{95%} 5,4-13,3, respectivamente).

Con la estrategia de medir la carga viral en lotes de muestras, fue factible detectar a todos los pacientes que presentaban fracaso del tratamiento

Cuadro 1. Características de los pacientes cuyas muestras de plasma se usaron para evaluar el desempeño de la detección de la carga viral de HIV en lotes de muestras

	Pacientes con diferente esquema de tratamiento antirretroviral	
	Primera línea (n=800)	Segunda línea (n=198)
Sexo		
Masculino	456 (57,0 %)	101 (51,0 %)
Femenino	328 (41,0 %)	93 (47,0 %)
Transgénero	16 (2,0 %)	4 (2,0 %)
Mediana de meses con el esquema de tratamiento antirretroviral	39 (RIC 24-49)	18 (RIC 16- 24)
Incidencia de fracaso virológico ^a	0,9 % (IC _{95%} 0,4-1,8)	8,6 % (IC _{95%} 5,4-13,3)

^a Fracaso virológico: resultado de carga viral de HIV mayor de 1.000 copias/ml de plasma

RIC: rango intercuartílico 1 y 3; IC: intervalo de confianza

antirretroviral, es decir que tenían una carga viral de ARN individual mayor de 1.000 copias/ml. El valor diagnóstico negativo fue similar usando la estrategia de medir la carga viral en lotes de muestras de pacientes con esquema de primera línea (100,0 %; IC_{95%} 99,5-100,0) y con esquema de segunda línea (99,4 %; IC_{95%} 96,9-99,9). Sin embargo, la eficacia relativa, es decir, el porcentaje de ahorro en las pruebas de laboratorio fue mayor en el grupo de pacientes con esquema de primera línea (74,0 %; IC_{95%} 71,0-76,7) que en el grupo de aquellos con esquema de segunda línea de tratamiento antirretroviral (50,9 %; IC_{95%} 44,4-57,3) ($p < 0,01$).

Con relación al tiempo empleado para las determinaciones de la carga viral, el ahorro de tiempo al procesar las muestras en lotes, en comparación con las determinaciones individuales, fue similar en las matrices de diez muestras y en las de cinco (cuadro 2).

Discusión

El elevado valor diagnóstico negativo que se obtuvo usando la estrategia de determinar la carga viral de HIV en lotes de muestras, garantiza con buen nivel de confianza, que en más del 99 % de los casos de pacientes que no presentan fracaso del tratamiento antirretroviral, la carga viral sea menor de 1.000 copias/ml.

En cuanto al porcentaje de ahorro en las pruebas de laboratorio, el hecho de que la eficacia relativa del esquema de primera línea de tratamiento antirretroviral fue significativamente mayor que el del esquema de segunda línea, se correlacionó inversamente con la diferencia significativa encontrada en la incidencia del fracaso del tratamiento antirretroviral en estos dos grupos. Esto es congruente con el reporte de May, *et al.*, quienes

Cuadro 2. Desempeño de la detección de carga viral de HIV en lotes de muestras de pacientes con diferente esquema de tratamiento antirretroviral

Indicador de desempeño	Pacientes con diferente esquema de terapia antirretroviral	
	Primera línea (n=800)	Segunda línea (n=198)
Valor diagnóstico negativo	100,0 % (IC _{95%} 99,5-100,0)	99,4 % (IC _{95%} 96,9-99,9)
Eficacia relativa ^a	74,0 % (IC _{95%} 71,0-76,7)	50,9 % (IC _{95%} 44,4-57,3)
Ahorro en tiempo	37,8 % (IC _{95%} 21,9-56,8)	38,2 % (IC _{95%} 16,6-65,8)

^a Eficacia relativa: porcentaje de ahorro de pruebas de laboratorio
IC: intervalo de confianza

realizaron una simulación computacional para evaluar el impacto de la prevalencia del fracaso del tratamiento antirretroviral en la eficacia relativa de la determinación de la carga viral del HIV en muestras organizadas en lotes, y concluyeron que la eficacia de esta estrategia disminuía al aumentar la proporción de individuos con fracaso del tratamiento antirretroviral en la población (7). Es más, los resultados obtenidos experimentalmente en la presente investigación concuerdan con las predicciones de May, *et al.*, tanto para la estrategia de la matriz de 10 x 10 como para la de 5 x 5 muestras, con una incidencia de fracaso del tratamiento antirretroviral de 0,9 y 8,6 %, respectivamente.

Según lo sugerido por van Zyl, *et al.*, en el diseño de esta investigación se hizo la revisión rápida de los registros digitales de los pacientes, con el fin de detectar a aquellos que cumplieran con los criterios para ser incluidos en la estrategia de determinación de la carga viral en lotes de muestras (8). Se incluyeron únicamente las muestras de los pacientes mayores de 18 años y se excluyeron aquellas de quienes no estaban recibiendo

el tratamiento; además, también se excluyeron las muestras de los individuos cuyo resultado de carga viral previo al estudio era mayor de 1.000 copias/ml. De no haberse hecho este proceso de selección, la proporción de pacientes con fracaso del tratamiento antirretroviral hubiera sido mayor y, por ende, la eficacia relativa habría resultado menor, como sucedió en el estudio de Pannus, *et al.*, quienes incluyeron a pacientes con sospecha de fracaso del tratamiento antirretroviral en sus lotes de muestras (16,3 % de las muestras), o en el estudio de Tilghman, *et al.*, en el que se incluyeron muestras de pacientes sobre quienes no había certeza de que estuvieran recibiendo antirretrovirales (18,0 % de las muestras), situación que tuvo un impacto negativo en el porcentaje de ahorro de pruebas de laboratorio, lo cual los llevó a recomendar que los antecedentes de fracaso del tratamiento antirretroviral debían considerarse al diseñar algoritmos para la determinación de la carga viral de HIV por lotes de muestras (6,9).

Este aspecto es muy importante en la implementación y la optimización de esta estrategia, no solo en cuanto a los costos, sino también en cuanto a la operación, ya que esto reduce el número de repeticiones que deben hacerse. Por otra parte, en un contexto de recursos limitados, la disminución de costos en los insumos de laboratorio necesarios para el seguimiento de los pacientes con tratamiento antirretroviral mediante la determinación de la carga viral en lotes de muestras, permitiría ampliar las coberturas y haría factible la sostenibilidad a largo plazo de este servicio.

Además, se le puede considerar como una estrategia complementaria para evaluar el cumplimiento de las metas 90-90-90 que propone ONUSIDA para eliminar la epidemia en el 2030, especialmente, la de alcanzar, en el 2020, cargas virales de ARN menores de 1.000 copias/ml en el 90 % de las personas con tratamiento antirretroviral. Es más, en países de recursos limitados y niveles intermedios de resistencia del HIV a los medicamentos antirretrovirales previa al tratamiento, como Guatemala, el dinero ahorrado en las pruebas para determinar la carga viral podría emplearse para introducir rutinariamente la detección de mutaciones puntuales asociadas a la resistencia del HIV antes de que los pacientes inicien su tratamiento antirretroviral (10). La medición de la resistencia previa al tratamiento repercutiría positivamente en la disminución del riesgo de fracaso del tratamiento antirretroviral en los primeros meses de la terapia, disminuiría su

prevalencia y, por ende, ayudaría a cumplir la meta de 90 % de personas en tratamiento antirretroviral con supresión virológica.

En conclusión, la estrategia de determinar la carga viral del HIV en muestras organizadas en lotes es un enfoque preciso y económico para evaluar la eficacia del tratamiento antirretroviral, ya que permite determinar si los pacientes presentan fracaso del tratamiento antirretroviral o no.

Con el fin de optimizar la eficacia de la estrategia, es recomendable seleccionar solamente las muestras de pacientes que hayan estado recibiendo tratamiento antirretroviral durante los 12 meses anteriores, lo que asegura, al menos, dos controles previos de carga viral indetectable y el que no haya antecedente reciente de fracaso del tratamiento antirretroviral. Además, es conveniente hacer diferentes lotes de muestras dependiendo del tipo de esquema de tratamiento antirretroviral, así como de las diferentes prevalencias de fracaso del tratamiento antirretroviral para maximizar el porcentaje de ahorro en pruebas de laboratorio.

Agradecimientos

Al equipo administrativo y de laboratorio de la Clínica de Enfermedades Infecciosas del Hospital Roosevelt, en especial, a Claudia Estrada, Jorge Rodas, Nataly García y Carola Melgar, por su invaluable colaboración.

Conflicto de intereses

Ninguno.

Financiación

Este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACYT), otorgado por la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT) de Guatemala (proyecto FODECYT 49-2011).

Referencias

1. **World Health Organization.** Consolidated guidelines on general HIV care and the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: Recommendations for a public health approach. London: WHO; 2013.
2. **Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS).** 90-90-90 An ambitious treatment target to help end the AIDS epidemic. Geneva: UNAIDS; 2014. Fecha de consulta: 20 de abril de 2016. Disponible en: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/90-90-90_en_0.pdf
3. **Roberts T, Bygrave H, Fajardo E, Ford N.** Challenges and opportunities for the implementation of virological testing in resource-limited settings. *J Int AIDS Soc.* 2012;15:17324. <https://doi.org/10.7448/IAS.15.2.17324>

4. **Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Programa Nacional de VIH/Sida, Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud, USAID| Proyecto Capacity Centroamérica.** Informe final de la evaluación de la adherencia al tratamiento antirretroviral y condiciones institucionales que puedan influir en el proceso, Guatemala 2015. Guatemala: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social; 2015.
5. **Smith DM, May SJ, Pérez-Santiago J, Strain MC, Ignacio C, Haubrich RH, et al.** The use of pooled viral load testing to identify antiretroviral treatment failure. *AIDS*. 2009;23:2151-8. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283313ca9>
6. **Pannus P, Fajardo E, Metcalf C, Coulborn RM, Durán LT, Bygrave H, et al.** Pooled HIV-1 viral load testing using dried blood spots to reduce the cost of monitoring antiretroviral treatment in a resource-limited setting. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2013;64:134-7. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3182a61e63>
7. **May S, Gamst A, Haubrich RH, Benson CA, Smith D.** Pooled nucleic acid testing to identify antiretroviral treatment failure during HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010;53:194-201. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181ba37a7>
8. **van Zyl GU, Preiser W, Potschka S, Lundershausen AT, Haubrich R, Smith D.** Pooling strategies to reduce the cost of HIV-1 RNA load monitoring in a resource-limited setting. *Clin Infect Dis*. 2011;52:264-70. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq084>
9. **Tilghman MW, Guarena DD, Licea A, Pérez-Santiago J, Richman DD, May S, et al.** Pooled nucleic acid testing to detect antiretroviral treatment failure in México. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011;56:e70-4. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181ff63d7>
10. **Ávila-Ríos S, García-Morales C, Garrido-Rodríguez D, Tapia-Trejo D, Girón-Callejas AC, Mendizábal-Burastero R, et al.** HIV-1 drug resistance surveillance in antiretroviral treatment-naïve individuals from a reference hospital in Guatemala, 2010-2013. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2015;31:401-11. <https://doi.org/10.1089/aid.2014.0057>