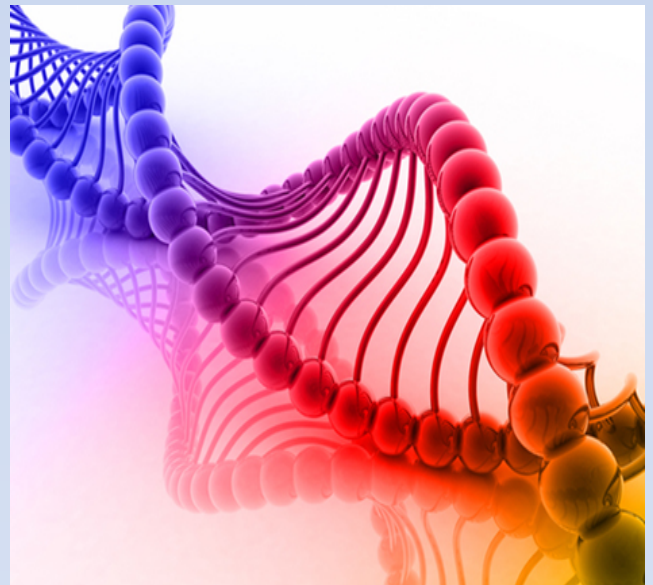
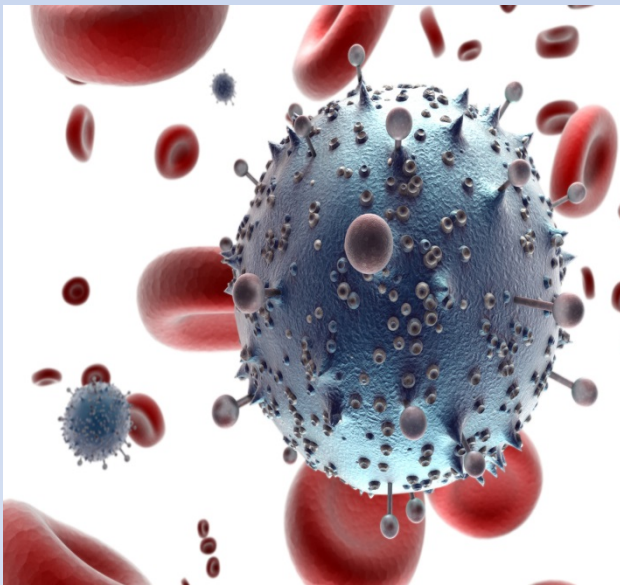


Tesis doctoral

Diversidad del VIH- 1. Transmisión dinámica y resistencias primarias en los nuevos diagnósticos de VIH- 1 en la población de Málaga (HUVV) durante los años 2004- 2015



Gabriel Sena Corrales


**Departamento de Medicina y Dermatología
Facultad de Medicina
Universidad de Málaga
2017**

**Directores de tesis:
Dr. Jesús Santos González
Dra. Isabel Viciano Ramos
Dra. Carmen María González Domenech**



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Gabriel Sena Corrales

 <http://orcid.org/0000-0003-1229-4360>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

Universidad de Málaga



Tesis doctoral

Diversidad del VIH-1. Transmisión dinámica y resistencias primarias en los nuevos diagnósticos de VIH-1 en la población de Málaga (HUVV) durante los años 2004-2015

Directores de Tesis

Dr. Jesús Santos González

Dra. Isabel Viciano Ramos

Dra. Carmen María González Domenech

Doctorando

Gabriel Sena Corrales





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

D. JESÚS SANTOS GONZÁLEZ, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y DERMATOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del tribunal **D. Gabriel Sena Corrales** sobre el trabajo de investigación que lleva por título “Diversidad del VIH-1. Transmisión dinámica y resistencias primarias en los nuevos diagnósticos de VIH-1 en la población de Málaga (HUVV) durante los años 2004-2015”, ha sido realizado bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que lo hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el Tribunal designado para tal efecto por la Universidad de Málaga.

Málaga, 13 de enero de 2017.





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

D^a ISABEL VICIANA RAMOS, PROFESORA ASOCIADA CLÍNICA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA CLÍNICA DE LA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del tribunal **D. Gabriel Sena Corrales** sobre el trabajo de investigación que lleva por título “Diversidad del VIH-1. Transmisión dinámica y resistencias primarias en los nuevos diagnósticos de VIH-1 en la población de Málaga (HUVV) durante los años 2004-2015”, ha sido realizado bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que lo hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el Tribunal designado para tal efecto por la Universidad de Málaga.

Málaga, 13 de enero de 2017.





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

D^a CARMEN MARÍA GONZÁLEZ DOMENECH, DOCTORA EN FARMACIA POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA. INVESTIGADORA POSTDOCTORAL, GRUPO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS, INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE MÁLAGA (IBIMA).

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del tribunal **D. Gabriel Sena Corrales** sobre el trabajo de investigación que lleva por título “Diversidad del VIH-1. Transmisión dinámica y resistencias primarias en los nuevos diagnósticos de VIH-1 en la población de Málaga (HUVV) durante los años 2004-2015”, ha sido realizado bajo mi dirección, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que lo hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el Tribunal designado para tal efecto por la Universidad de Málaga.

Málaga, 13 de enero de 2017.





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría darle las gracias a mis directores: Jesús Santos González, Isabel Viciano Ramos y Carmen María González Domenech. Para mí ha sido un placer haber sido vuestro doctorando, y sin vosotros no hubiera sido posible este trabajo. Mil gracias.

Agradecer también a los compañeros de la Unidad de Enfermedades Infecciosas por todo el tiempo que han empleado en la recogida de datos y en atender a los pacientes que han participado en este trabajo. Igualmente me gustaría mostrar mi agradecimiento hacia todo el personal que forma parte del Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga, no solo por todo lo que me han enseñado durante 4 años como residente, sino también por todo el cariño y afecto que me han mostrado.

A mis amigos, por estar siempre ahí y por todo el apoyo que me han dado, me han demostrado la suerte y lo afortunado que me siento de tener los amigos que tengo.

A mi gran amigo de cuatro patas: Marley.

A mi familia. A mis abuelos. A mi hermano Abelardo y a mí cuñada Paz. No tengo palabras para describir todo lo valientes y luchadores que sois, me habéis enseñado la lección más importante que me ha dado la vida, sois muy grandes.

A mi madre y a mi padre, por todo el apoyo que me han dado siempre, porque me siento muy orgulloso de ellos, todo lo que soy y lo que tengo es gracias a vosotros.

A mi compañera de viaje, Eva. Gracias por estar a mi lado, por tener siempre tu mano tendida, porque siempre estás ahí para apoyarme, por llenar mi vida.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A mis padres
A mi familia y amigos
A Eva y a Marley



TITULO

Diversidad del VIH-1. Transmisión dinámica y resistencias primarias en los nuevos diagnósticos de VIH-1 en la población de Málaga (HUVV) durante los años 2004-2015.

RESUMEN

Las Guías de Práctica Clínica recomiendan la realización de un test genotípico de resistencia en todos los pacientes diagnosticados de infección por el VIH-1. Disponer de la secuencia de la retrotranscriptasa (RT) y de la proteasa (PR) en estos pacientes nos abre la posibilidad de profundizar en la epidemiología molecular de la infección por el VIH-1 en el área geográfica correspondiente, mediante la realización de estudios filogenéticos. La filogenia ha demostrado ser una herramienta muy útil para describir y clasificar la variabilidad del VIH-1, convirtiéndose en el método *gold estándar* para la subtipificación. Sin embargo, en la práctica clínica habitual se usan herramientas de subtipado automáticas, que presentan limitaciones para la correcta clasificación de algunos subtipos no-B, especialmente de las formas recombinantes circulantes (CRFs).

Los objetivos de nuestro trabajo han sido por un lado, analizar los diferentes agrupamientos y cadenas de transmisión (CT) en nuestra cohorte, estudiando dentro de ellas la evolución de las resistencias primarias, y, por otro, evaluar la sensibilidad y especificidad de tres herramientas informáticas rápidas para el subtipaje, las diferencias entre ellas y su concordancia con el análisis filogenético.

Hemos incluido en nuestro estudio a los pacientes diagnosticados de infección por el VIH-1 en el Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga entre los años 2004 y 2015. Este intervalo de tiempo se dividió en 2 periodos: Periodo A, entre 2004-2009 y Periodo B, entre 2010-2015. A los pacientes se les realizó determinación de la viremia plasmática y detección de mutaciones de resistencias genotípicas del VIH-1 mediante secuenciación de ácidos nucleicos, utilizando Secuenciación Sanger entre 2004 y 2014 y Pirosecuenciación en el año 2015.

De los 757 pacientes con estudio de resistencia genotípica al diagnóstico de la infección por el VIH-1, 118 presentaron resistencia a fármacos antirretrovirales, lo que implica una prevalencia global de resistencias primarias del 15,6%. La prevalencia en el periodo A fue menor que en el periodo B [12,0% (41/341) vs 18,5% (77/416); $p=0,014$]. Los porcentajes de resistencia para cada familia de antirretrovirales fueron: Inhibidores

de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINN) (10,1%), inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN) (5,0%) e inhibidores de la proteasa (2,2%).

En cuanto a la presencia de multirresistencia, el 90,6% de los pacientes presentaron resistencia a una sola familia, el 6,7% a dos familias y el 2,5% a las 3 familias, con similar distribución por periodos, a excepción de los pacientes que presentaron resistencia a una sola familia, en los que se observó un mayor porcentaje de resistencia en el segundo periodo.

A partir de la secuencia del gen *pol*, hicimos el subtipado mediante 4 métodos: 3 herramientas automáticas basadas en diferentes criterios (Geno2pheno, Rega y COMET); y un análisis filogenético. La reconstrucción filogenética fue inferida por el método de Máxima verosimilitud (*Maximum likelihood*) mediante el programa FastTree a través de la plataforma CIPRES. Se tomó como criterio para la asignación a un subtipo determinado, el agrupamiento consistente (valores de *bootstrap* $\geq 70\%$) con una secuencia de referencia. Las secuencias que no pudieron asociarse a un subtipo puro o CRF conocida fueron analizadas con el programa Simplot para encontrar señales de recombinación.

Para el análisis de las cadenas de transmisión se empleó en primer lugar el programa MEGA v6.06 y el método *Neighbor Joining* (NJ) para obtener una filogenia preliminar. De ella eliminamos todas aquellas secuencias que formaban parte de ramas con valores de *bootstrap* menores al 80%. Finalmente, construimos un nuevo árbol filogenético por el método de *Maximum likelihood* con FastTree a través de CIPRES. Así, seleccionamos los *clusters* con un valor de *bootstrap* $\geq 90\%$ y se realizó un estudio de las CT en general y otro pormenorizado de aquellas representadas por cinco secuencias o más, analizando las diferentes variables de interés clínico, epidemiológico y virológico.

559 pacientes presentaron subtipo B (73,8%), y 198 subtipo no-B (26,2%), siendo la forma CRF51_01B (5,8%) la más prevalente, seguida de CRF19_cpx (2,8%) y CRF02_AG y CRF30_0206 (1,8%). La distribución de las variantes del VIH-1 en la clasificación del subtipo B variaba de forma significativa según el método utilizado para la determinación del subtipo viral ($p < 0,001$), siendo similar el porcentaje encontrado en la filogenia (73,8%) y la herramienta Rega (75,6%) por un lado, y COMET (82,6%) y

Geno2pheno (83,6%), por otro. En las variantes no-B también encontramos diferencias significativas ($p < 0,003$) dependiendo de la opción de subtipado utilizada.

Rega mostró mayor correlación con el estudio filogenético en el subtipo B (73,8% vs 75,6%), y también para los no-B (24,4% vs 26,2%). Considerando la cohorte completa, la sensibilidad de las tres herramientas automáticas era superior al 90%, destacando entre ellas la versión 3.4 de Geno2pheno, con una sensibilidad cercana al 100% (99,18; IC 95%: 98,46-99,90). Sin embargo, cuando nos centramos en las variantes no-B, solo Rega 3.0 se acercó a una sensibilidad para identificarlas del 50% (46,46; IC 95%: 39,52-53,41), si bien la especificidad era superior al 90% en todos los casos.

Al realizar el estudio filogenético, 451 pacientes (59,6%) se agruparon en 53 CT o *clusters* diferentes, 17 de ellas formadas por cinco o más pacientes cada una. El estudio epidemiológico mediante el análisis filogenético nos ha permitido demostrar que, en nuestra área, más del 50% de los pacientes se agrupa en una CT, alguna de ellas con número elevado de sujetos. En la mayoría de los casos la transmisión de estas cepas ocurre entre hombres que tienen sexo con hombres. Son de especial interés las CT en las cuales se agrupan pacientes con subtipos no-B y con resistencia a alguna familia de antirretrovirales, fundamentalmente a ITINN.

De los 118 pacientes que presentaban resistencia a las diferentes familias de antirretrovirales, 94 (79,7%) se asociaron a alguna CT.

INDICE DE ABREVIATURAS

ADNc	ADN complementario
ADNg	ADN genómico
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN transferente
ARV	Antirretrovirales
Bps	Pares de bases
CA	Cápside
CDC	<i>Center for Diseases Control</i>
COMET	<i>COntext-based Modeling for Expeditious Typing</i>
CoRIS	Cohorte de la Red de Investigación en SIDA
CRFs	Formas recombinantes circulantes
CT	Cadena de transmisión
CVP	Carga viral plasmática
CyPA	Ciclofilina A
dNTP	Nucleótidos trifosfato
emPCR	PCR en emulsión
GEMES	Grupo Español Multicéntrico para el Estudio de Seroconvertidores
GESIDA	Grupo Español de Estudio de SIDA
HSH	Hombres que tienen sexo con hombres
HTX	Heterosexuales
IC	Índice de confianza
IN	Integrasa
INI	Inhibidores de la integrasa
IP	Inhibidores de la proteasa

IQR	Rango intercuartílico
ITIAN	Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleós(t)idos
ITINAN	Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleós(t)idos
ITS	Infecciones de transmisión sexual
LIA	Inmunoensayo en línea
LTR	Secuencia terminal repetida larga
MA	Matriz
NC	Nucleocápside
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NJ	<i>Neighbor Joining</i>
NPJ	Neumonía por <i>Pneumocystis jirovecii</i>
NLS	Señales de localización nuclear
OMS	Organización Mundial de la Salud
PPi	Pirofosfato
PR	Proteasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RIS	Red de Investigación en SIDA
RNP	Complejo ribonucleoproteico
RT	Transcriptasa inversa o retrotranscriptasa
RT-PCR	Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SIVsm	Virus de la inmunodeficiencia del <i>Sooty mangabey</i>
SVM	<i>Support Vector Machine</i>
sstADN	ADN de hebra sencilla
TAR	Tratamiento antirretroviral

TARGA	Terapia Antirretroviral de Gran Actividad
TDR	Transmisión de resistencias a los fármacos antirretrovirales
UNG	AmpErase uracilo N-glicosilasa
UDVP	Usuarios de drogas por vía parenteral
URFs	Formas recombinantes únicas
VHB	Virus de la Hepatitis B
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VIH-1	Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1
WB	Western Blot

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Biología del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)	1
1.2. Estructura del VIH	5
1.3. Ciclo vital del VIH	8
1.3.1. Penetración del virus	9
1.3.2. Síntesis del provirus	9
1.3.3. Transporte nuclear e integración	9
1.3.4. Expresión génica	10
1.3.5. Ensamblaje del virión	10
1.4. Curso clínico de la infección por VIH	11
1.4.1. Primoinfección o fase aguda	11
1.4.2. Infección crónica o asintomática	11
1.4.3. Aparición de SIDA	12
1.5. Diagnóstico de laboratorio de la infección por VIH	12
1.5.1. Técnicas de detección de la infección por VIH	12
1.5.1.a. Técnicas de screening: ELISA	13
1.5.1.b. Ensayos confirmatorios	15
1.5.2. Otras técnicas de diagnóstico	17
1.6. Determinación de la viremia plasmática (carga viral)	18
1.7. Generalidades del tratamiento antirretroviral	20
1.8. Estudio de resistencias a antirretrovirales	20
1.8.1. Pruebas para la detección de resistencias	21
1.8.1.a. Técnicas genotípicas	22
1.8.1.b. Técnicas fenotípicas	24
1.8.2. Limitaciones de los test de resistencias	24
1.9. Filoepidemiología del VIH	25
2. JUSTIFICACIÓN	28
3. OBJETIVOS	30
4. MATERIAL Y MÉTODOS	31

4.1. Ámbito de trabajo	31
4.2. Pacientes	31
4.2.1. Recogida de datos clínicos	31
4.3. Procesamiento de las muestra	34
4.4. Determinación de la viremia plasmática (carga viral)	34
4.5. Determinación de resistencias a antirretrovirales de VIH-1	35
4.5.1. TRUGENE HIV-1® (Siemens Diagnostics)	35
4.5.2. ViroSeq® VIH-1 Genotyping System v2.0	37
4.5.3. Pirosecuenciación mediante el sistema Junior 454-S Roche Molecular®	39
4.6. Subtipado y análisis de cadenas de transmisión	41
4.6.1. COMET (<i>C</i> Ontext-based <i>M</i> odeling for <i>E</i> xpeditious <i>T</i> yping)	41
4.6.2. Geno2pheno versión 3.4	42
4.6.3. Rega versión 3.0	42
4.6.4. Análisis filogenético <i>ad hoc</i>	43
4.6.5 Evaluación estadística de las distintas herramientas de subtipado.	46
4.7. Análisis estadístico	47
4.7.1. Análisis descriptivo	47
4.7.2. Análisis bivariante	48
4.8. Aspectos éticos	48
5. RESULTADOS	49
5.1. Características basales de los pacientes	49
5.2. Frecuencia de las mutaciones de resistencia	51
5.3. Prevalencia de resistencias	54
5.4. Subtipado	62
5.4.1. Métodos de subtipado	62
5.4.2. Análisis de los subtipos	66
5.5. Dinámica de transmisión del VIH-1	71
5.5.1. Análisis filoepidemiológico de las cadenas de transmisión	71
5.5.2. Importancia de los <i>clusters</i> de transmisión en la propagación de resistencias	76

6. DISCUSIÓN	92
7. CONCLUSIONES	103
8. BIBLIOGRAFÍA	104
9. ANEXO	

1. INTRODUCCIÓN

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Biología del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) es el agente productor del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), una enfermedad conocida desde hace más de 30 años que ha alcanzado proporciones pandémicas. El VIH-1 se incluye dentro de la familia *Retroviridae*¹, una familia de virus ARN que agrupa diversos agentes virales que poseen una enzima denominada transcriptasa inversa o retrotranscriptasa (RT)².

La familia *Retroviridae* (Tabla 1) incluye 7 géneros identificados, agrupados en 2 subfamilias: *Orthoretrovirinae* y *Spumaretrovirinae*. Se considera que sólo dos de los 7 géneros son patógenos humanos: Lentivirus y Retrovirus BLV-HTLV.

Tabla 1. Clasificación de la familia *Retroviridae*.

Familia	Género	Virus
<i>Retroviridae</i>	Lentivirus	VIH-1, VIH-2
	Retrovirus BLV-HTLV	HTLV-I, HTLV-II
	Spumavirus	Spumavirus humano

En 1911, Francis Peyton Rous describió el primer miembro de los Retrovirus: el virus del Sarcoma de Rous³. En 1970⁴, Howard Temin y David Baltimore caracterizaron la enzima RT, logrando así explicar cómo esta creciente familia de virus ARN podía convertir su genoma en ADN e integrarlo en el cromosoma de la célula infectada. En 1980, Robert Gallo y su grupo descubrieron el primer retrovirus humano, el HTLV-I, inicialmente relacionado con la leucemia de células T. Este mismo grupo, al año siguiente, describiría el HTLV-II, vinculado esta vez con una rara leucemia de células peludas. Sin embargo, no es hasta el año 1983 cuando el VIH-1 es aislado por el grupo de Françoise Barre-Sinoussi y Luc Montagnier en el Instituto Pasteur de Paris en pacientes con inmunodeficiencia¹.

Introducción

Posteriormente se identificaron dos tipos diferentes de VIH: VIH-1 y VIH-2, que comparten un 40-50% de similitud genética y tienen una organización genómica similar. Aunque el VIH-2 también puede producir inmunodepresión, es menos patógeno y tiene una menor capacidad de transmisión⁵. En la Figura 1 podemos observar cómo el VIH-2 está relacionado filogenéticamente con el virus SIVsm, virus de la inmunodeficiencia del *Sooty mangabey*, una variedad de mono muy frecuente en África occidental, mientras que el VIH-1 proviene del agente que infecta a la variedad de chimpancé *Pan troglodytes troglodytes*, SIVcpz, que habita en zonas del sur de Camerún^{6,7}.

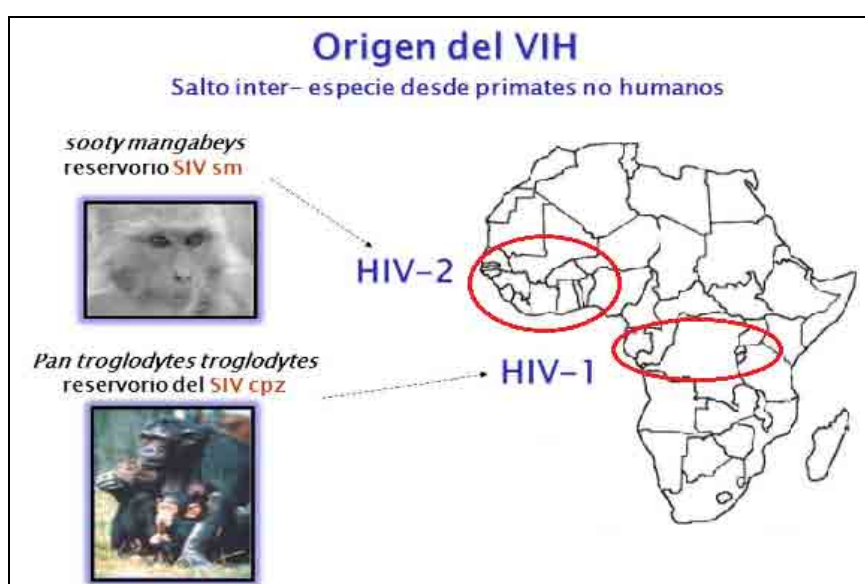


Figura 1. Orígenes del VIH-1 y VIH-2

La transmisión del SIVcpz del chimpancé a la especie humana se piensa que ocurrió alrededor del año 1900. La caza y el consumo de carne de chimpancé se postulan como los mecanismos de exposición al virus más probable. Inicialmente, la infección en humanos por el VIH-1 se mantuvo limitada a pequeños grupos de población hasta que alcanzó, seguramente a través del Río Congo, la ciudad de Kinshasa, un núcleo urbano en rápida expansión, alrededor de la década de 1930-40⁸. Diferentes estudios han demostrado que es en esta ciudad donde existe una mayor variedad de cepas así como indicios de la divergencia del virus hacia la infección de una nueva especie, la humana. A partir de este punto, mediante el contacto sexual y la práctica sanitaria con material contaminado, el VIH-1 logra diseminarse por todo el

Introducción

continente hasta que finalmente, en los años setenta, se introduce en el mundo desarrollado. Así, los primeros casos de SIDA se detectan en E.E.U.U. a principios de los ochenta⁹.

Los virus SIV, aún siendo virus de la inmunodeficiencia de los simios, al menos en tres ocasiones saltan la barrera de especie (Figura 2), originando los tres principales grupos del VIH-1: grupo M (*major*), grupo O (*outlier*) y grupo N (no M, no O). Existe un cuarto grupo llamado P (*putative*), descrito más recientemente¹⁰.

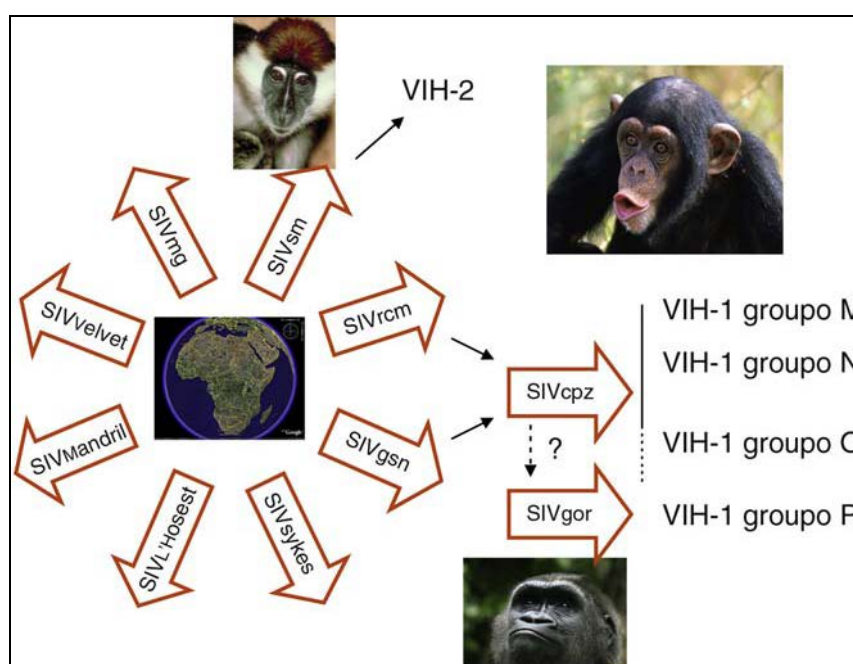


Figura 2. Variedades de SIV y saltos inter-especie⁹

El grupo M es el causante de la pandemia de VIH-1 a nivel mundial y se subdivide en 9 subtipos (A-D, F-H, J y K)¹⁰. El subtipo mayoritario es el C, responsable del 50% de las infecciones por VIH-1. En los países industrializados de Norteamérica, Europa, Australia y Japón, predomina el subtipo B (Figura 3). Dentro del grupo M, también debemos destacar las formas recombinantes circulantes (CRF), que aparecen por recombinación de fragmentos genómicos de distintos subtipos. Actualmente se han descrito más de 79 CRFs y su número se incrementa constantemente (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>; acceso 07/09/2016).

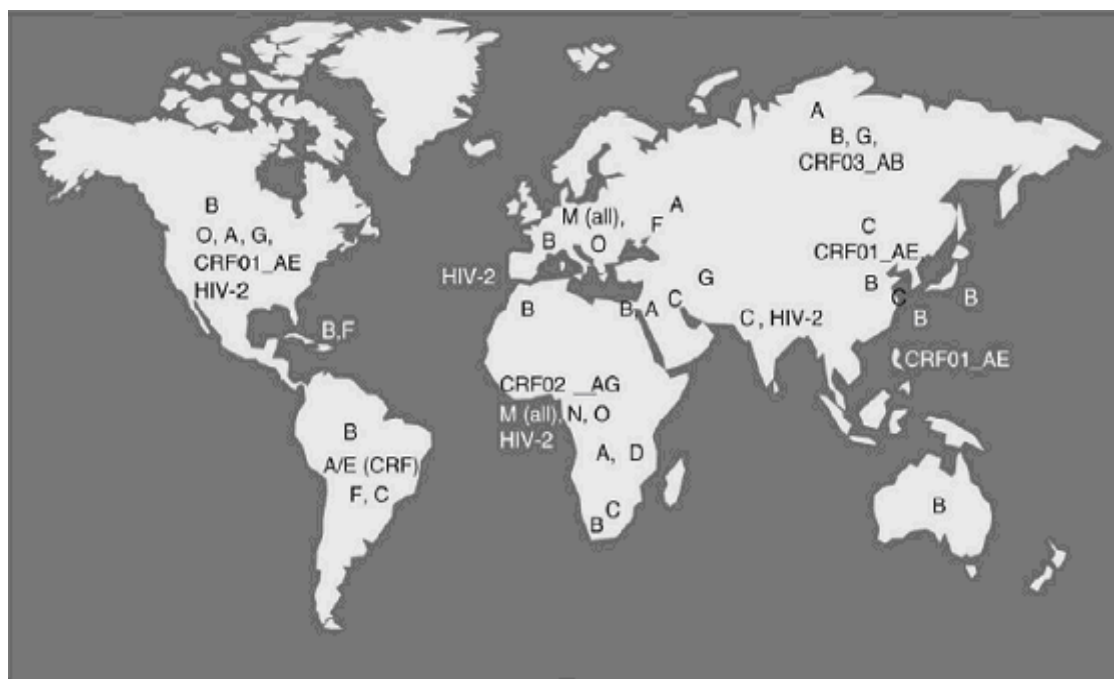


Figura 3. Distribución geográfica de la diversidad del VIH-1 (subtipos del Grupo M) y VIH-2⁹

Las variantes no-B desempeñan un papel muy importante en la pandemia del VIH-1, causando aproximadamente el 90% de las infecciones¹¹. Entre esas variantes, los subtipos A, C, CRF01_AE y CRF02_AG son los más frecuentes, siendo responsables de casi el 70% de todos los casos. La prevalencia de estas variantes no-B ha ido en aumento en Europa Occidental en los últimos años, fundamentalmente como consecuencia de los movimientos de población. Así, aunque la prevalencia del subtipo B sigue siendo mayoritaria en España, igual que en el resto de Europa y América, se está observando una circulación creciente de subtipos no-B, principalmente los subtipos G y la CRF02 AG. En españoles nativos, el porcentaje de variantes no-B aumentó desde el 1,5% en 2000-2002 al 11,4% en el periodo de 2007 a 2010, afectando también a la población no inmigrante¹².

1.2. Estructura del VIH-1

El VIH-1 es un virus envuelto de forma esférica, con un diámetro de 100-120 nm (Figura 4). La envoltura consiste en una bicapa lipídica formada por gemación a partir de la membrana de la célula hospedadora. En esta bicapa se encuentran presentes la proteína Env y la glicoproteína 160 (gp160), que se encuentra anclada en la membrana y mediante escisión por determinadas proteasas celulares, da lugar a las glicoproteínas gp41 y gp120.

La estructura y funcionalidad de Env juega un papel muy importante en la interacción del virus con los receptores celulares (tropismo) así como en la evasión a la respuesta inmune del huésped¹³. De hecho, la dificultad para encontrar una vacuna eficaz frente a la infección por VIH-1 está directamente relacionada con Env¹⁴.

Por debajo de la envoltura, se encuentra la matriz viral de estructura icosaédrica, formada por la proteína MA (p17). En el centro del virus y con forma de cono está la cápside, constituida por la proteína viral CA (p24), que es la más abundante de toda la partícula. En el interior de la cápside, las proteínas virales PR (p15), RT (p55 y p66), IN (p11), NC (p17)-y L1 (p6), las dos cadenas idénticas de ARN y un par de iniciadores de ARN transferente (ARNtLys)¹⁵.

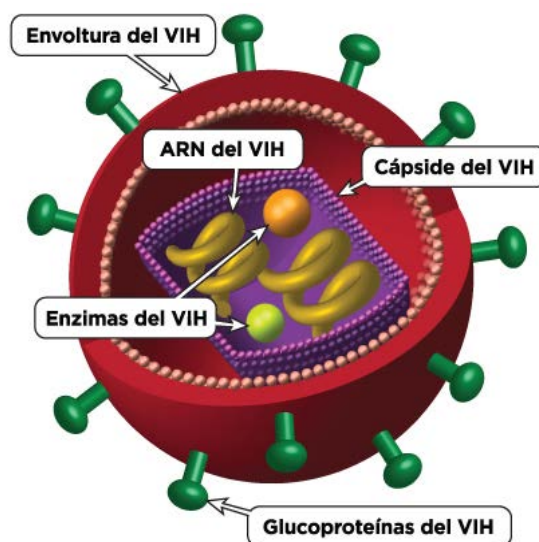


Figura 4. Esquema general de la estructura de la partícula de VIH-1. Imagen extraída de <https://infosida.nih.gov>

Introducción

Existen en el genoma tres regiones codificantes, *gag*, *pol* y *env*. El gen *gag* codifica las principales proteínas estructurales: la proteína de matriz p17 y la proteína de la cápside p24. El gen *pol* codifica las tres enzimas principales para el ciclo infectivo del virus: la proteasa (PR), la RT y la integrasa (IN). El gen *env* codifica la glicoproteína externa (Env), responsable de la infectividad de la partícula viral a través de la unión a receptores específicos de la célula. Además existen 6 genes denominados inicialmente accesorios: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpu* y *vpr*, que incrementan la complejidad de la organización y expresión del VIH-1¹⁶.

En la Tabla 2 se describen las proteínas que son codificadas por los nueve genes del VIH-1. La proteína Vif interacciona con una proteína de defensa en la célula humana llamada APOBEC3G (A3G), anulando su efecto antiviral y favoreciendo la replicación del VIH-1¹⁷. Vpr participa en el transporte al núcleo del complejo viral pre-integración.

Tat y Rev actúan como proteínas reguladoras uniéndose a regiones específicas del ARN viral: TAR y RRE, respectivamente. La proteína Tat tiene un papel fundamental en la replicación del VIH-1, ya que actúa como un potente activador del proceso de transcripción. La proteína Rev facilita la salida al citoplasma de los ARN mensajeros actuando como un factor de exportación nuclear.

La proteína Nef tiene diferentes funciones: induce regulación negativa de células CD4 y moléculas HLA de clase I en la superficie de las células infectadas, lo que permite la evasión de un ataque por linfocitos CD8 citotóxicos¹⁸; esta proteína también participa en la activación de linfocitos T como consecuencia de su unión a varias proteínas que intervienen en las vías de transducción de señales intracelulares.

Introducción

Tabla 2. Tamaño, localización y función de las proteínas que codifican los 9 genes del VIH-1.

Nombre	Tamaño (kDa)	Función	Localización
<i>gag</i>			
MA	p17	Anclaje de la membrana. Transporte al núcleo	Virión
CA	p24	Cápside	Virión
NC	p7	Nucleocápside, unión a ARN	Virión
	p6	Unión a Vpr	Virión
<i>pol</i>			
PR	p15	Corte de Gag/Pol y maduración	Virión
RT	p66,p51	Retrotranscripción y actividad ARNsa H (p15)	Virión
IN	p31	Integración del provirus	Virión
Env	gp120/gp41	Glicoproteína de envoltura, unión a CD4 y co-receptores	Membrana externa del virión
Tat	p16/p14	Transactivador transcripcional	Núcleo y nucleolo
Rev	p19	Transporte de ARN fuera del núcleo	Vehículo nucleolo-citoplasma
Vif	p23	Infectividad (anula A3G)	Citoplasma y virión
Vpr	p10-15	Transporte nuclear, estabiliza ciclo celular en G2/M	Virión
Vpu	p16	Liberación de partículas en la membrana (anula Tetherin)	Membrana
Nef	p27-25	Inhibe la expresión de CD4 y HLA clase I	Membrana y citoplasma

CA: cápside; IN: integrasa; MA: matriz; NC: nucleocápside; PR: proteasa; RT: retrotranscriptasa.

1.3. Ciclo vital del VIH-1

Se resume de forma gráfica en la Figura 5.

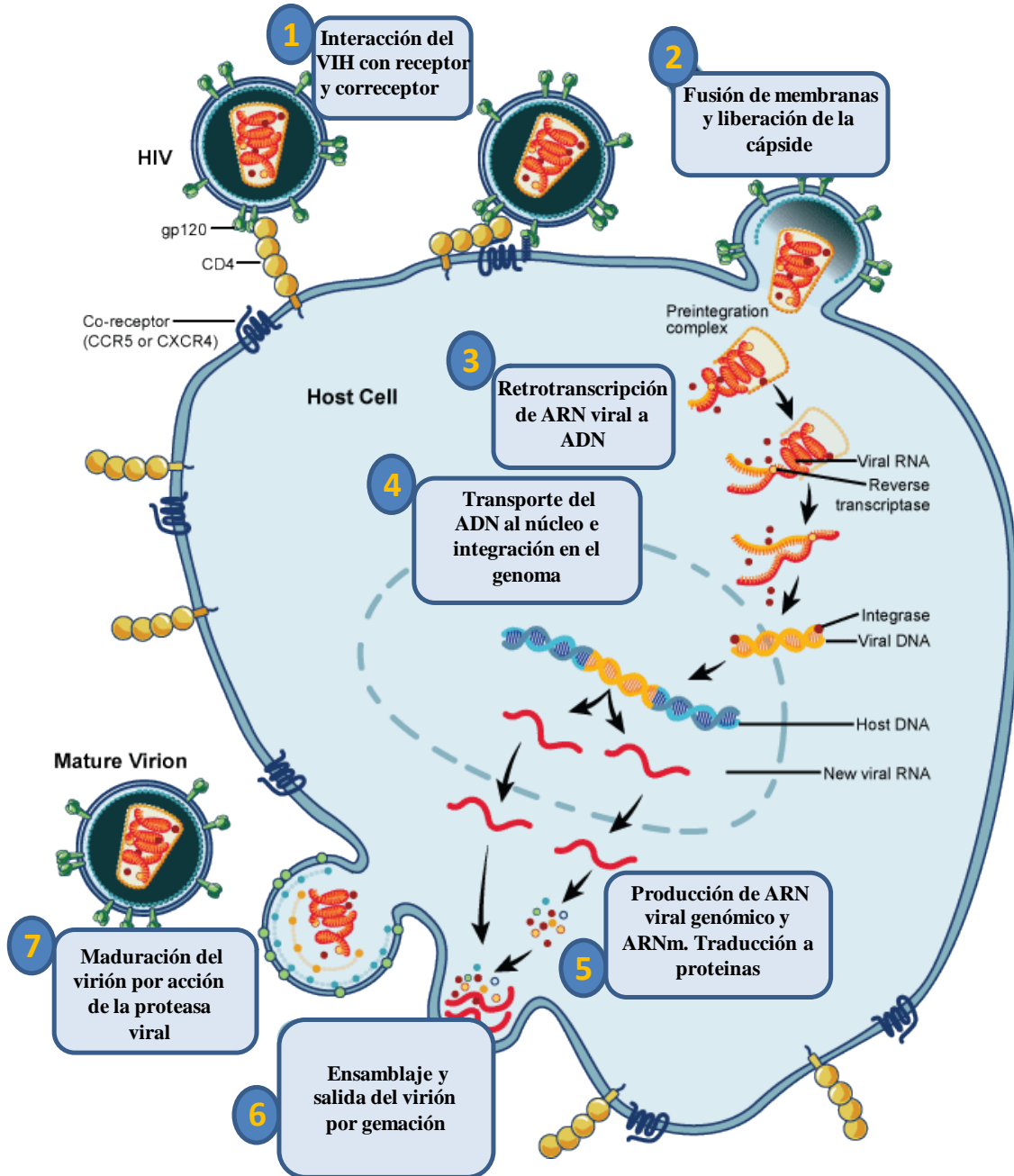


Figura 5. Ciclo Vital del VIH-1. Modificado del *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*, EE. UU. (<http://niaid.nih.gov>)

1.3.1. Penetración del virus en la célula diana

La célula diana principal del virus son los linfocitos T CD4+, que expresan en su superficie dos receptores necesarios para la entrada del virus: la propia molécula CD4 y un receptor de quimiocinas (CCR5 ó CXCR4), que actúa como correceptor^{19,20}.

El ciclo vital del VIH-1 comienza cuando se produce la interacción del virus con la célula diana a través de la unión de la glicoproteína gp120 de la envoltura viral con el receptor celular CD4 y un receptor de quimiocinas (CCR5 ó CXCR4).

El VIH-1, como otros retrovirus, infecta a las células de forma pH-independiente, a través de la fusión directa entre la membrana viral y celular²¹.

1.3.2. Síntesis del provirus

Tras la penetración del virus, tiene lugar la desestructuración de la cápside y la activación de la RT viral. Un complejo ribonucleoproteico (RNP) conocido como "complejo de preintegración" se estructura en el citoplasma de la célula infectada y es responsable de la transcripción reversa y del transporte al núcleo. El RNP contiene el ARN genómico junto a las proteínas NC y MA, y las enzimas virales RT e IN²². Durante la retrotranscripción, las dos moléculas de ARN del virión serán convertidas a una doble cadena lineal de ADN por la acción de la RT.

1.3.3. Transporte nuclear e integración

El complejo constituido por el ADN proviral de doble cadena unido a proteínas es transportado al núcleo de la célula infectada. Las tres proteínas virales más importantes en el proceso de translocación nuclear son MA, IN y Vpr²³⁻²⁷. Uno de los primeros pasos en la importación nuclear del complejo es el reconocimiento de señales de localización nuclear (NLS), presentes en el complejo de preintegración.

El ADN del VIH-1 es integrado en el genoma celular a través de la acción de la IN viral en sitios localizados al azar, aunque se han descrito regiones de alta probabilidad de integración²⁸⁻²⁹.

El provirus integrado es homólogo al ADN viral, excepto en algunos nucleótidos eliminados de cada extremo, además de la presencia de cortas repeticiones procedentes

Introducción

del genoma del huésped³⁰. La integración requiere que la integrasa reconozca los extremos del ADN viral (los sitios ATT). Esta enzima cataliza la eliminación de dos pares de bases de los extremos 3' de cada cadena de ADN viral exponiendo un dinucleótido CA, muy conservado entre todos los retrovirus³¹. Este ADN viral procesado es unido entonces a los extremos 5' del ADN celular, previamente cortados, a través de una reacción de transesterificación³². Las enzimas celulares reparan entonces las uniones generando las repeticiones que flanquean las secuencias virales, lo cual es una característica propia de los retrovirus, ya que se ha comprobado que éstos presentan al final de su genoma unas secuencias genéticas características denominadas “secuencias terminales repetidas largas” (*long terminal repeat*, LTR).

1.3.4. Expresión génica

El provirus integrado y flanqueado por los LTRs se organiza como una unidad transcripcional eucariótica. La transcripción del provirus, vía ARNpol II celular, da lugar a un transcrito primario que va a tener dos funciones:

- Servir como ARN genómico para incorporarse en el virión.
- Ser procesado para proveer todos los ARN mensajeros (ARNm), que van a codificar las proteínas virales.

El promotor del VIH-1 es regulado por factores celulares y virales y su actividad varía dependiendo del estado celular. En muchas células de individuos VIH-1 positivos la expresión del virus es indetectable. De este modo puede existir un estado de latencia en células individuales, aunque la infección esté crónicamente activa debido a la expresión continua de VIH-1 en una fracción de las células.

1.3.5. Ensamblaje del virión

La maduración por acción de la proteasa viral que procesa las poliproteínas precursoras, va a ser un paso crucial para la producción de viriones infectivos, ya que las partículas virales conteniendo las moléculas precursoras no son infectivas.

Los productos de los genes *gag* y *pol*, las proteínas p55 y p160, precursores proteicos, son incorporados en el ensamblaje del virus. Dos moléculas de ARN genómico son también encapsuladas junto a las moléculas de ARNt.

Introducción

Las proteínas accesorias Vif y Vpr y posiblemente Nef son también incorporadas al virión junto con las proteínas celulares, jugando un papel importante en el proceso de ensamblado³³⁻³⁵. En algunos casos, estas proteínas celulares son muy importantes para la infectividad viral³⁶⁻³⁷. Una vez ensambladas, las nuevas partículas virales salen por gemación de la célula huésped.

Una de las peculiaridades del VIH-1 es el requerimiento de ciclofilina A (CyPA) para la infectividad del virus³⁸⁻³⁹. CyPA es una chaperona con actividad peptidil-isomerasa, que tiene un papel general en el plegamiento proteico⁴⁰⁻⁴¹ y se cree que interacciona directamente con la proteína Gag³⁹ y probablemente sea necesaria para el correcto plegamiento de Gag⁴².

1.4. Curso clínico de la infección por el VIH-1

En la infección por el VIH-1 podemos diferenciar hasta 3 períodos (Figura 6):

1.4.1. Primoinfección o fase aguda⁴³. La infección aguda es la fase inicial de infección por el VIH-1. La penetración del VIH-1 en el organismo, producida bien a través de mucosas (contacto sexual) o por vía parenteral (transfusión de hemoderivados de personas infectadas o uso de material de inyección contaminado), da lugar aproximadamente a las dos semanas a una elevada viremia, que perdura alrededor de tres o cuatro semanas. Estos altos valores de viremia, junto con la elevada capacidad replicativa del virus, producen una gran diseminación por todo el organismo, con especial afectación del sistema linfático y sistema nervioso central.

El individuo puede permanecer asintomático, aunque un porcentaje que oscila entre el 30 y el 50% presenta un síndrome mononucleósico muy parecido al producido por el virus de Epstein-Barr, que tiene una gran trascendencia por la posibilidad de detectar precozmente la infección. Va a ser en este periodo de la enfermedad donde va a existir un mayor riesgo de transmisión por la elevada viremia.

1.4.2. Infección crónica o asintomática. La segunda fase es la infección crónica por el VIH-1 (también llamada infección asintomática o fase de latencia clínica). Durante esta fase de la enfermedad, la fuerte respuesta inmunológica frente al virus (seroconversión) va a reducir considerablemente los valores de viremia de la

Introducción

primoinfección. Muchas personas con infección crónica por el VIH-1 no presentan ningún síntoma. La ausencia de una terapia antirretroviral efectiva supondría que, transcurridos aproximadamente de 10 a 12 años, la infección crónica evolucionaría a SIDA.

1.4.3. Desarrollo de SIDA. Es la fase final de la infección por el VIH-1. Debido al deterioro progresivo del sistema inmunitario provocado por el virus, pueden aparecer enfermedades oportunistas definitorias de SIDA que, sin tratamiento, conducen a la muerte del paciente.

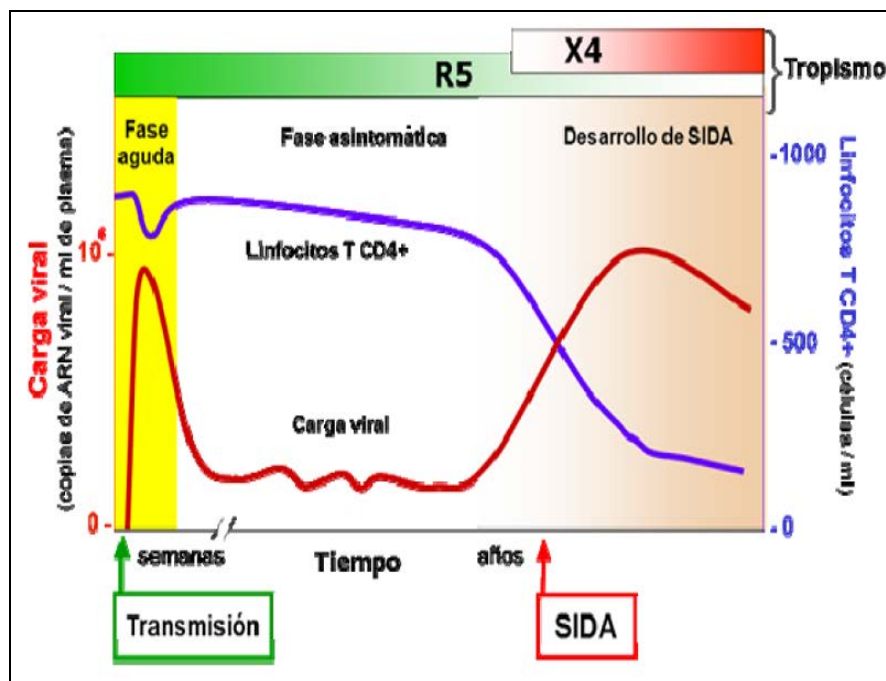


Figura 6. Curso clínico de la infección por VIH-1⁴⁴

1.5. Diagnóstico de laboratorio de la infección por VIH-1

1.5.1. Técnicas de detección de la infección por VIH-1

El diagnóstico de la infección se va a realizar detectando la presencia de anticuerpos específicos frente al VIH-1, que se encuentran en el suero de prácticamente el 100% de las personas infectadas⁴⁵. La sensibilidad de estas técnicas es del 99%, ya

Introducción

que la seroconversión no ocurre hasta las 3-4 semanas. Además pueden existir infectados seronegativos, como consecuencia de defectos en el sistema inmune⁴⁶.

Para el diagnóstico serológico de la infección por VIH-1 se realiza la detección simultánea de anticuerpos VIH-1/2 y del antígeno p24 del VIH-1.

Los ensayos serológicos para esta determinación van a ser de cribado (*screening*) o de confirmación. Los ensayos de cribado nos van a permitir identificar las muestras reactivas y deben tener una sensibilidad superior; los ensayos de confirmación deben tener una especificidad superior, para conocer si las muestras reactivas con un ensayo de cribado contienen anticuerpos específicos para el VIH-1/2.

1.5.1.a. Técnicas de screening: ELISA

La calidad diagnóstica de esta técnica está determinada por la selección del punto de corte o “*cut-off*” y, sobre todo, por la base antigénica utilizada para la captura de los anticuerpos específicos de la muestra.

Las técnicas de primera generación aparecieron en 1985 y usaban como base antigénica un lisado vírico. Estas técnicas evolucionaron hacia las de segunda generación, incorporando ya como antígenos proteínas recombinantes y péptidos sintéticos y nuevos antígenos que permitían la detección de anticuerpos frente a todos los subtipos M, los grupos N y O, y frente a VIH-2.

En 1994, aparecieron los ELISA de tercera generación, que consiguieron acortar el periodo ventana a 22 días. Posteriormente se modificaron estas técnicas a una tercera generación mediante el uso de sustratos fluorescentes (ELFA) o formatos de quimioluminiscencia. Hoy en día, contamos con las llamadas técnicas de cuarta generación, que detectan simultáneamente anticuerpos y antígeno p24, consiguiendo así reducir el periodo ventana a 13-15 días.

Introducción

En la Figura 7, se muestran los días que transcurren desde la fecha de infección hasta que se positivizan las diferentes técnicas de diagnóstico.

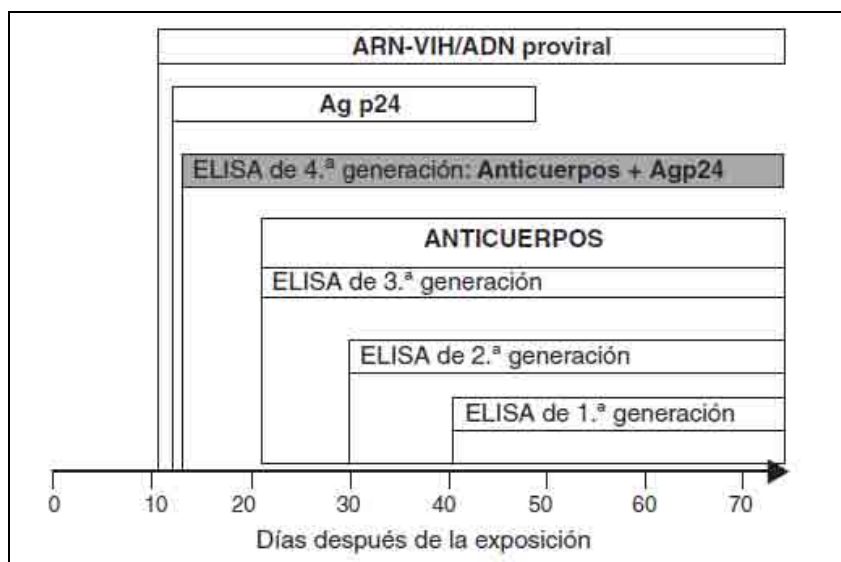


Figura 7. Tiempo de aparición de marcadores específicos de infección por el VIH-1⁴⁶

Existen diferentes situaciones en las que los test de ELISA pueden ofrecer resultados **falsos negativos**⁴⁶:

- En fases muy iniciales de la infección, hasta que se produce la seroconversión.
- En estadios finales de la misma.
- Pacientes con tratamiento inmunosupresor.
- Trasplantedos de médula ósea.
- Personas con alteraciones de linfocitos B.
- Pacientes con hipogammaglobulinemia.
- Infectados por tipos de VIH no detectados por la base antigénica.
- Error en la identificación de las muestras.

Introducción

En otras situaciones es posible obtener resultados **falsos positivos**⁴⁷⁻⁴⁹.

- Pacientes hemodializados.
- Politransfundidos.
- Pacientes con hepatitis alcohólica.
- Personas con infecciones agudas por otros virus como herpes y Virus de la Hepatitis B (VHB).
- Vacunados frente a VHB o gripe.
- Pacientes con enfermedades autoinmunes.
- Personas con anticuerpos frente a diversos antígenos HLA.

Debido a la posibilidad de estas reactividades no específicas hay que recurrir a las pruebas confirmatorias para verificar los resultados positivos de las técnicas de *screening*.

1.5.1.b. Ensayos confirmatorios

Las técnicas confirmatorias utilizadas con mayor frecuencia son el Western Blot (WB) y el *immunoblot* recombinante o inmunoensayo en línea (LIA).

Inmunoensayo en línea (LIA)

El fundamento de esta técnica diagnóstica⁵⁰, se basa en un inmunoensayo en tira que utiliza antígenos derivados de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos del VIH-1 y VIH-2 y un péptido sintético del grupo O del VIH-1, permitiéndonos así confirmar la presencia de anticuerpos contra el VIH-1, incluyendo el grupo O, y el VIH-2 en suero o plasma humano.

Esta técnica utiliza cinco antígenos del HIV-1: sgp120 y gp41, que detectan anticuerpos específicos contra el VIH-1, y p31, p24 y p17, que también pueden reaccionar de forma cruzada con anticuerpos contra el VIH-2. Los péptidos del grupo O del VIH-1 están presentes en la banda sgp120 del VIH-1. Los antígenos gp36 y sgp105 se aplican para detectar anticuerpos contra el VIH-2. Por tanto esta técnica no solo se

Introducción

utiliza para la confirmación de la infección por VIH, sino también para diferenciar entre el VIH-1 y VIH-2.

Western Blot (WB)

Esta técnica diagnóstica se fundamenta en que las distintas proteínas víricas se van a separar en función de su peso molecular mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, transfiriéndose a una membrana de nitrocelulosa sobre la que se añadirá el suero del paciente. Cuando se produce la reacción antígeno-anticuerpo se observa una banda coloreada que define la reactividad en WB. Esta técnica nos va a permitir detectar anticuerpos frente a las glicoproteínas de envoltura gp160, gp120 y gp41, las codificadas por el gen *gag*, p55, p24 y p17 y las proteínas enzimáticas p66, p51 y p31; incluso existen algunas casas comerciales que incluyen al menos una proteína del gen *env* del VIH-2, lo que permite identificar las infecciones producidas por dicho tipo vírico⁴⁶.

El WB tiene como uno de sus principales inconvenientes la lectura de las bandas para hacer la interpretación, ya que la mayoría de las veces es subjetiva. Así hace necesario que en cada laboratorio se establezca una norma de lectura^{45,46}.

La ausencia de bandas se interpretará como un resultado negativo y para valorar los resultados positivos podremos aplicar criterios que establecen distintas organizaciones o incluso seguir los criterios de interpretación del fabricante. El *Center for Diseases Control* (CDC) va a considerar un resultado como positivo cuando se observan dos bandas de p24, gp41, y gp160/gp120, mientras que la Organización Mundial de la Salud (OMS) cuando hay al menos dos bandas de glicoproteínas.

Se interpreta como indeterminado cualquier resultado de la prueba que no reúna los criterios mínimos de positividad. Las causas del WB indeterminado son varias y entre ellas podemos destacar varias situaciones⁴⁹:

- Fases tempranas o estadios avanzados de la infección con deterioro inmunológico grave.
- Presencia de inmunocomplejos que pueden reducir los anticuerpos circulantes.
- Recién nacidos de madre VIH positiva.

Introducción

- Sueros hemolizados, inactivados por calor, con factor reumatoide con bilirrubina elevada.
- Reacciones cruzadas con otros retrovirus.
- Sueros de pacientes infectados por subtipo no-B o con hipergammaglobulinemia secundaria a la hiperestimulación antigénica.
- Multitransfundidos.
- Situaciones patológicas como conectivopatía, gammapatía policlonal y lupus eritematoso diseminado.

Si se detecta alguna banda de envoltura con o sin bandas del gen *gag*, también puede deberse a infección por el VIH-1; en esta situación se debe recurrir a otras pruebas confirmatorias (LIA ó IFI) e, incluso, en ocasiones complementarlas con otras técnicas como la determinación de la carga viral plasmática (CVP) o antígeno p24 libre sérico para valorar una posible primoinfección. En cualquier caso ante un Western Blot indeterminado se debe solicitar siempre una nueva muestra⁴⁹.

1.5.2. Otras técnicas de diagnóstico

Detección de antígeno p24

Su detección puede ser de gran ayuda en situaciones en las que la determinación de anticuerpos no es concluyente de un diagnóstico serológico positivo⁵¹. Normalmente se encuentra disponible en centros de referencia

Determinación del ADN proviral

Se denomina así al ADN del VIH-1 integrado en el genoma celular. Debido a las dificultades de disponer de ensayos comerciales, la determinación del ADN proviral no es una técnica muy utilizada; se emplea en situaciones como el diagnóstico en los recién nacidos de madres VIH positivas.

1.6. Determinación de la CVP

La determinación de la CVP (número de copias de ARN del virus que se encuentra presente en plasma) es de gran importancia a la hora de la toma de decisiones terapéuticas y para la monitorización del tratamiento antirretroviral (TAR), junto con la cifra de linfocitos CD4 y la situación clínica del paciente⁵². Otras indicaciones son ayuda al diagnóstico de la infección aguda, diagnóstico de la transmisión materno-fetal y la valoración del riesgo de transmisión⁴⁵.

En general, se recomienda determinar la CVP al diagnóstico de la infección y previo al tratamiento si se difiere éste. Posteriormente a las 4 semanas y luego de forma periódica durante el tratamiento.

Existen en el mercado diversas técnicas para la cuantificación de la carga viral, la gran mayoría de ellas tienen una sensibilidad entre 20-50 copias/mL.

De forma general podemos decir que todas las técnicas comerciales detectan y cuantifican el subtipo B (el más prevalente en nuestro medio) y los subtipos circulantes más frecuentes pero casi ninguna de ellas detecta el VIH-2, cuya CVP se determina tan solo en centros de referencia. Las técnicas empleadas hoy día (Tabla 3), son de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real, basadas en sondas fluorescentes, que son técnicas muy rápidas y que permiten rangos de detección más amplios (20-10⁷ copias/mL), e incluso la detección de los grupos N y O.

Introducción

Tabla 3. Principales técnicas disponibles para la determinación de la CVP⁴⁵.

	Abbott Real Time HIV-1 (m2000rt)	COBAS® Ampliprep/ COBAS® Taqman HIV-1, v2.0 (Roche)	Nuclisens® EasyQ HIV-1 v1.2 (bioMérieux)	Versant® HIV-1 RNA 1.0 (kPCR) (Siemens)	Artus HI Virus-1 QS-RGQ (Qiagen)
Amplificación	PCR a tiempo real	PCR a tiempo real (Taqman)	NASBA y detección a tiempo real con molecular beacons	PCR a tiempo real (Taqman)	PCR a tiempo real
Rango de carga viral	40 copias/mL 10 millones copias/mL	20 copias/mL 10 millones copias/mL	10 copias/mL 10 millones copias/mL	37 copias/mL 11 millones copias/mL	34 copias/mL 44 millones copias/mL
Subtipos	Grupo M- subtipos A-D, F-H, J; varias CRFs incluidas CRF01_AE y CRF02_AG; Grupo N y O. No detecta VIH-2.	Grupo M- subtipos A-D, F-H; varias CRFs incluidas CRF01_AE y CRF02_AG; Grupo O. No detecta VIH-2.	Grupo M- subtipos A-D, F-H, J; CRF01_AE y CRF02_AG; No detecta VIH-2.	Grupo M- subtipos A-D, F-H; CRF01_AE y CRF02_AG; Grupo O. No detecta VIH-2.	Grupo M- subtipos A-D, F-H. No detecta VIH-2.
Grado de automatización	Equipo de extracción automatizado, separado del equipo de amplificación/ detección	Equipo integrado en una plataforma	Equipo de extracción automatizado, separado del equipo de amplificación/ detección	Equipo de extracción automatizado, separado del equipo de amplificación/ detección	Equipo de extracción automatizado, separado del equipo de amplificación/ detección
Tiempo de procesamiento	6 h	6 h	4 h	5,15 h	5 h
Número de test/run	96	72	72	96	72

1.7. Generalidades del TAR

El ciclo infectivo del VIH-1 muestra varios puntos clave que han sido elegidos para el diseño de fármacos antirretrovirales (ARV) que bloqueen su replicación⁵². Dos de las enzimas fundamentales que intervienen en el mismo, la RT y la proteasa, han sido tradicionalmente dianas moleculares idóneas para las primeras familias de fármacos ARV, que se podrían denominar como “clásicas”: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos (ITIAN) o no análogos de nucleós(t)idos (ITINN), e inhibidores de la proteasa (IP). Posteriormente, surgieron los inhibidores de la fusión y los antagonistas del correceptor CCR5; y en último lugar, teniendo en cuenta la integrasa como otra enzima fundamental que interviene en el ciclo del virus, otra familia de fármacos ARV de gran importancia, los inhibidores de la integrasa (INI).

La zidovudina fue el primer fármaco que se utilizó frente al VIH-1⁵³. Posteriormente, se observó que el uso simultáneo de dos ITIAN aumentaba el beneficio clínico e inmunológico del TAR, si bien no se conseguía reducir de forma sostenida la viremia plasmática⁵⁴. A finales de 1995 la eficacia demostrada por la asociación de un IP y dos ITIAN dio lugar a la generalización de la triple terapia o terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) que ha llevado a una drástica disminución de la morbi-mortalidad de los pacientes con infección por el VIH-1⁵⁵.

Desde hace años las pautas recomendadas para el tratamiento de la infección por el VIH-1 consisten en una combinación de tres fármacos que incluyan dos ITIAN asociado a un INI, a un ITINN o a un IP potenciado. Con estas combinaciones en más del 75% de los casos se puede conseguir una CVP inferior a 50 copias/mL a las 48 semanas de tratamiento⁵².

1.8. Estudio de las resistencias a antirretrovirales

La vigilancia de la transmisión de cepas del VIH-1 resistentes a los fármacos antirretrovirales (TDR) nos permite definir estrategias de tratamiento efectivas para conseguir reducir la replicación y transmisión del VIH-1⁵⁶.

Las indicaciones para la utilización de las pruebas de resistencias según el Grupo Español de Estudio de SIDA (GESIDA) incluyen⁵²:

Introducción

1. Pacientes sin tratamiento previo: se debe realizar un test de resistencias en todos los pacientes en el momento del diagnóstico de la infección por el VIH-1 y en el momento de iniciar tratamiento si éste se difiere. Inicialmente se han de investigar las mutaciones de resistencia en la RT y PR; solamente se realizará estudio en la integrasa viral en aquellos casos en los que exista una alta sospecha de transmisión de resistencias a esta familia. Cuando se vaya a iniciar tratamiento con un antagonista de CCR5, se debe realizar un test genotípico para conocer el tropismo viral

2. Pacientes con tratamiento antirretroviral: el test de resistencias está recomendado en todo fracaso al TAR. Se han de investigar mutaciones de resistencia en la integrasa solo en aquellos casos de fracaso a esta familia. En pacientes en fracaso con un antagonista de CCR5 se debe determinar también el tropismo viral.

La vigilancia de la TDR, en particular en aquellos pacientes con diagnóstico reciente, nos va a permitir analizar las características de las cepas prevalentes en ese momento y definir las estrategias de tratamientos que serán más efectivas. La Organización Mundial de la Salud primero en 2007⁵⁷ y finalmente en 2009⁵⁸ elaboró una serie de recomendaciones acerca de cómo estudiar y describir la prevalencia de las TDR, lo que se traduce en la práctica clínica en el desarrollo de estrategias de prevención que intenten disminuir la transmisión de la infección por el VIH-1⁵⁹⁻⁶⁰

1.8.1. Pruebas para la detección de resistencias

Actualmente se encuentran disponibles en el mercado varias técnicas para la detección de resistencias a antirretrovirales, que pueden clasificarse en 2 tipos: **genotípicas** y **fenotípicas**⁴⁶.

Las pruebas genotípicas emplean el análisis de secuencias del genoma viral para detectar la presencia de mutaciones asociadas con resistencia a antirretrovirales, comparándola con la secuencia de una cepa salvaje. Estas pruebas utilizan diferentes herramientas bioinformáticas para el análisis de las secuencias.

Las pruebas fenotípicas constituyen el método más directo para detectar y cuantificar las resistencias a los diferentes fármacos antirretrovirales, estableciendo la concentración necesaria de fármaco para inhibir en un 50% (IC₅₀) la replicación de la cepa viral en estudio.

Introducción

1.8.1.a. Técnicas genotípicas

El método genotípico de referencia para la determinación de la resistencia del VIH-1 a los fármacos antirretrovirales es la detección de mutaciones en la secuencia del gen *pol*, de la región que codifica para las enzimas RT y PR⁴⁵. El método más utilizado que se basa en la secuenciación unidireccional es la secuenciación tipo Sanger o método enzimático, también llamado de síntesis abortiva de los dideoxynucleótidos. Otro método que podemos emplear es la secuenciación bidireccional, en la que se marcan los cebadores o *primers*.

TRUGENETM HIV-1 Genotyping Test (Siemens NAD) y ViroSeqTM HIV genotyping system (Abbott Diagnostics) han sido las técnicas comerciales de secuenciación que más se han utilizado. Las principales diferencias entre ambas se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Características de las principales técnicas comerciales de secuenciación.

	TRUGENETM HIV-1 Genotyping Test (Siemens NAD)	ViroSeqTM HIV genotyping system (Abbott Diagnostics)
Secuenciación	Bidireccional	Unidireccional
Electroforesis	En gel	Capilar
Detección de mutaciones	RT y proteasa	RT, proteasa e integrasa

Las nuevas metodologías de genotipado como las plataformas de secuenciación masiva de última generación (454, Illumina, PacBio, Ion Torrent, etc...) poseen un nivel de sensibilidad en la detección de variantes minoritarias comparable a la de los ensayos fenotípicos. La pirosecuenciación se diferencia del método de secuenciación tradicional de Sanger en que la señal que se detecta es la de liberación de pirofosfato (PPi) cuando se incorporan los nucleótidos, mientras que en Sanger la detección se basa en la terminación de la cadena con dideoxynucleótidos.

Las diferentes técnicas de secuenciación nos van a permitir obtener una secuencia de nucleótidos que, una vez editada, se traduce en una secuencia de

Introducción

aminoácidos, que compararemos con la de una cepa de referencia del VIH-1, determinando si existen mutaciones en la secuencia de la cepa en estudio. De esta manera podremos analizar las secuencias de la RT, PR e integrasa en busca de mutaciones que confieran resistencia al tratamiento.

El elevado número de mutaciones de resistencia que existen, y la posibilidad de que se produzcan interacciones entre ellas, hacen que sea muy difícil conocer la significación clínica de todas, por lo que los ensayos genotípicos suelen acompañarse de un informe sobre la interpretación de las mutaciones detectadas. Para hacer una correcta interpretación del genotipo de resistencias es imprescindible una continua actualización por la aparición de nuevos patrones de resistencia y por la incorporación de nuevos fármacos. Se han diseñado distintos algoritmos de interpretación que facilitan esta labor. Entre los principales destacan los diseñados por los siguientes organismos y universidades:

- Universidad de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu>)
- Sociedad Internacional de SIDA de EE.UU. (www.iasusa.org)
- ANRS francesa (www.hivfrenchresistance.org)
- Red de Investigación en SIDA –RIS– (www.retic-ris.net)
- Geno2pheno (www.geno2pheno.org)
- Fenotipo Virtual (Vircotype).

Hoy en día, estos algoritmos no sólo son capaces de interpretar las resistencias clásicas frente a ITIAN, ITINN e IP, sino también las nuevas mutaciones descritas frente a los INI. Sin embargo, cuando se comparan estos algoritmos entre sí, observamos que existen discrepancias entre ellos. En España, disponemos del algoritmo de la Red de Investigación en SIDA (RIS), actualizado periódicamente y disponible en www.retic-ris.net.

Por último, a la hora de interpretar el resultado de las pruebas de resistencia, debemos tener en cuenta no solo la historia previa de tratamiento antirretroviral del paciente, sino también considerar los estudios anteriores de resistencias que se hayan realizado, para disponer del genotipo acumulado.

1.8.1.b. Técnicas fenotípicas

Son estudios complejos y laboriosos que se realizan en laboratorios especializados y de investigación. Tienen la ventaja de valorar la sensibilidad del virus frente a cada fármaco. Los tres ensayos de virus recombinantes que se comercializan son: Antivirogram (Tibotec-Virco), PhenosenseTM (Virologic) y PhenoscriptTM (Viralliance-SAS)⁴⁵.

1.8.2. Limitaciones de los test de resistencia

La calidad de los resultados que obtengamos va a depender de las diferentes etapas del proceso: extracción del ARN, su posterior retrotranscripción en ADN y amplificación del gen *pol* mediante PCR, por lo que cualquier error que podamos tener en estas etapas, afectará de manera importante a los resultados obtenidos.

En las muestras con CVP superior a 500-1.000 copias/mL las técnicas de las que disponemos hoy en día nos aseguran entre un 98-100% de éxito en la amplificación; a partir de cargas virales menores, el porcentaje de éxito disminuye. Sin embargo, se ha demostrado que realizando las adecuadas modificaciones es posible conseguir la amplificación de cualquier muestra con CVP superior a 50 copias/mL; en este contexto, algunos estudios han puesto de manifiesto la utilidad clínica que supondría la detección de resistencias en pacientes con cargas virales bajas⁶¹⁻⁶².

En cuanto a la detección de todas las variantes o cuasiespecies virales, los métodos genotípicos o fenotípicos tradicionales solo son capaces de detectar una variante si ésta representa más del 20% del total de la población, por lo que el uso de estas técnicas clásicas van a conseguir predecir el fracaso de un fármaco pero no su éxito, pues existe la posibilidad de que variantes minoritarias puedan ser portadoras de mutaciones de resistencia y ser seleccionadas durante el tratamiento.

Para la detección de estas variantes minoritarias debemos recurrir a técnicas más complejas, como la clonación de los productos de amplificación, PCR mediante diluciones al límite o PCR a tiempo real. En este sentido, cobra un especial protagonismo los métodos de secuenciación masiva, que permiten la detección de mutaciones de resistencia presentes en tan solo el 0,5% de la población viral total⁶³ y cuya utilidad clínica ha quedado demostrada. El principal inconveniente es que se trata de técnicas con bastante procesado manual y muy laboriosas, que requieren mucho

Introducción

tiempo y personal altamente cualificado. Por ello, su implantación de forma habitual en un laboratorio se hace difícil, si bien son cada vez más los que incorporan esta metodología debido a las utilidades clínicas que tiene y a que se están desarrollando sistemas para poder automatizar las diferentes etapas del proceso.

El llevar a cabo de forma rutinaria un estudio de resistencias en todos los pacientes con infección por el VIH-1 en el momento del diagnóstico o de manera previa al inicio del TAR (GESIDA⁵², DHHS⁶⁴, IAS⁶⁵, EACS⁶⁶) hace que se pueda disponer de la secuencia de la RT y de la PR de estos pacientes. Esto, a su vez, nos permite profundizar en la epidemiología molecular de la infección por el VIH-1, ya que gracias a estas regiones del genoma vírico tenemos la posibilidad de realizar estudios filogenéticos⁶⁷.

1.9. Filoepidemiología del VIH-1

Una de las características más importantes del VIH-1 es su alta variabilidad genética, que se debe fundamentalmente a tres factores: carencia de actividad correctora de errores de la RT, tiempos cortos de replicación, y alta recombinación genética⁶⁸.

Desde su origen y mediante estos mecanismos, el VIH-1 se ha diversificado ampliamente en numerosas formas genéticas y subtipos, ya mencionados en el apartado 1.1. Además, la recombinación entre subtipos diferentes ha generado formas recombinantes intersubtipo, clasificadas como CRFs y formas recombinantes únicas (URFs). Las CRFs poseen puntos de recombinación comunes y conocidos, describiéndose en más de tres individuos no relacionados epidemiológicamente; por su parte, las URFs se han encontrado en individuos aislados o en grupos de personas infectadas relacionadas epidemiológicamente. Además, las URFs, a diferencia de las CRFs, no comparten puntos de recombinación inter-subtipo conocidos, por lo que no se pueden agrupar.

La prevalencia de subtipos no B se ha asociado tradicionalmente a población inmigrante tanto varones como mujeres y actualmente se ha incrementado la prevalencia en población autóctona en los hombres que tienen sexo con hombres (HSH)⁶⁹. Este cambio de tendencia podría, sobre todo, afectar al manejo clínico de la infección, ya que determinadas variantes no-B presentan sustituciones en posiciones relacionadas con la resistencia a determinados fármacos, acelerando la aparición de

Introducción

virus resistentes y poniendo en entredicho la interpretación de los algoritmos genotípicos de resistencia que se siguen hoy en día.

Los análisis filogenéticos, filodinámicos y filogeográficos constituyen las principales herramientas de epidemiología molecular del VIH-1, demostrando su gran utilidad a la hora de proporcionar inferencias sobre la dinámica de transmisión, parámetros epidemiológicos (prevalencia, incidencia, tiempo entre la infección y el diagnóstico, etc...) o las características espacio-temporales de la misma⁷⁰. La filogenia ha demostrado ser una herramienta muy útil para describir y clasificar la variabilidad de los virus ARN y, entre ellos, especialmente del VIH-1⁷⁰⁻⁷¹.

Los estudios de prevalencia de resistencias se han basado principalmente en los resultados derivados de los pacientes infectados por el subtipo B. Sin embargo, el resto de variantes del VIH-1 (subtipos no-B y formas recombinantes), tradicionalmente ignorados en los estudios, son responsables del 90% de los 33 millones de infecciones en todo el mundo. Se han descrito diferencias entre los subtipos genéticos a nivel de múltiples propiedades biológicas, tales como virulencia, progresión en la enfermedad, susceptibilidad a drogas antirretrovirales, etc⁷². Por ello, resulta fundamental una correcta identificación de los diferentes subtipos de VIH-1 y de las formas recombinantes circulantes.

El análisis filogenético es el método *gold standard* para la subtipificación, aunque no es ampliamente utilizado en el ámbito clínico debido a su complejidad. A pesar de sus limitaciones para la correcta clasificación de algunos subtipos no-B y, dentro de estos, sobre todo, de las formas recombinantes, el uso de herramientas de subtipado en línea se ha generalizado⁷³. Estos algoritmos son fáciles de usar y útiles en la práctica clínica para el seguimiento de los pacientes infectados por el VIH-1. Diferentes estudios que han evaluado la fiabilidad de las herramientas de subtipado en línea en comparación con el análisis filogenético, ponen de manifiesto un gran número de discordancias en la asignación de los subtipos no-B vs. B. Estas discrepancias dejan lagunas en el conocimiento de los patrones de mutaciones de resistencia a fármacos en las variantes no-B, especialmente para los fármacos IP⁷⁴.

Introducción

Para el análisis filogenético, las regiones del genoma viral que se utilizan fundamentalmente son *gag*, *pol* y *env*, especialmente *pol* por ser también la utilizada con más frecuencia para detectar mutaciones asociadas a resistencias a fármacos antirretrovirales⁷⁵. A partir del estudio de estas regiones del genoma podemos demostrar en una población determinada la presencia de individuos que presentan secuencias de VIH-1 altamente relacionadas (*clusters*); el posterior análisis de las características de estos *clusters* o agrupaciones va a permitir la identificación dentro de la población estudiada de diferentes cadenas de transmisión (CT), que será no solo fundamental para el control de la expansión del VIH-1 sino también para el control de la propagación de TDR dentro de grupos donde existe un especial riesgo de transmisión.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

2. JUSTIFICACIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

2. JUSTIFICACIÓN

El Grupo de Investigación Clínica en Infección VIH del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), desarrolla actualmente su trabajo en las siguientes líneas de investigación:

- Infección por el VIH-1: seguimiento de la epidemia de VIH-1 a nivel provincial.
- Estudios sobre co-morbilidades en pacientes VIH-1 (ENOS).
- Infecciones de transmisión sexual (ITS).
- Tratamiento antirretroviral (TAR).
- Participación en la red nacional de investigación de SIDA.

El diseño de los fármacos antirretrovirales así como la mayoría de los ensayos de susceptibilidad a fármacos, los listados de mutaciones de resistencia y los sistemas de interpretación de estas mutaciones, están basados en aislados del VIH-1 pertenecientes al subtipo B, mayoritario en los países desarrollados. Sin embargo, los subtipos no-B y formas recombinantes del VIH-1 predominan a nivel global (90%), introduciéndose de manera creciente en el mundo desarrollado, incluido España, por el aumento de la movilidad geográfica desde zonas endémicas.

El análisis filogenético es el método más fiable para asignar de forma correcta un subtipo VIH-1. Sin embargo, debido a su complejidad, muchos profesionales de la salud utilizan herramientas de subtipaje rápido disponibles en Internet. Éstas consisten en páginas web en las que se introducen las secuencias del VIH-1 generadas para el estudio de resistencias y que asignan, de forma automática, un determinado subtipo o recombinante basándose en diversos criterios (estadísticos, de similitud, filogenéticos,...). Estas herramientas pueden ser útiles para la identificación del subtipo B y ciertos no-B, pero su eficacia es mucho menor en las restantes variantes.

Por otro lado, en los últimos años, el uso de técnicas de análisis filogenético también se ha convertido en una potente herramienta en el campo de la epidemiología molecular. Mediante estudios filogenéticos podemos describir las diferentes cadenas de transmisión del VIH-1 existentes en una población y en una zona geográfica determinada, controlar la transmisión de cepas del VIH-1 con resistencia a los antirretrovirales (TDR) dentro de grupos de especial riesgo, etc.

El Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga (HUVV) sirve de centro de referencia para el estudio de las resistencias a antirretrovirales dentro de nuestra provincia. El disponer de la secuencia de la transcriptasa reversa (RT) y de la proteasa (PR) en estos pacientes nos abre la posibilidad para profundizar en la epidemiología molecular de la infección VIH en nuestra área geográfica, pues estas regiones del genoma vírico son precisamente las más empleadas en la filogenia del mismo.

El gran interés clínico y epidemiológico que supone conocer todo esto, unido a que hoy en día, no existe ningún estudio en curso que trate de evaluar la presencia de cadenas de transmisión en nuestra área, son las principales razones por las que se ha planteado el siguiente trabajo:

“Diversidad del VIH-1: transmisión dinámica y resistencias primarias en los nuevos diagnósticos de vih-1 en la población de Málaga (HUVV) durante los años 2004-2015”

3. OBJETIVOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

3. OBJETIVOS

1. Describir las **características clínicas, epidemiológicas y virológicas de la infección VIH-1** en una cohorte de pacientes diagnosticados en el **periodo 2004-2015** en el área de Málaga.
2. Analizar la **prevalencia de resistencias primarias a fármacos antirretrovirales** y su **evolución a lo largo del tiempo**.
3. Evaluar la **sensibilidad y especificidad de tres herramientas informáticas rápidas** para el **subtipaje**. Analizar las **diferencias entre las mismas** y su **concordancia con respecto al análisis filogenético**.
4. Conocer la **prevalencia de los diferentes subtipos de VIH-1** en los pacientes de nuestra área y su relación con parámetros epidemiológicos, clínicos e inmunoviroológicos.
5. Analizar los diferentes **agrupamientos y cadenas de transmisión** en nuestra cohorte en base al **estudio filogenético**. Establecer su **relación con parámetros epidemiológicos, clínicos e inmunoviroológicos**.
6. Establecer una relación entre las distintas **cadenas de transmisión** con **patrones de resistencia genotípico**.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

4. MATERIAL Y MÉTODOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Ámbito de trabajo

Este estudio se ha desarrollado en la Unidad de Gestión Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva del Hospital Universitario Virgen de la Victoria, un hospital de segundo nivel que presta atención sanitaria a la zona oeste de Málaga. Cubre a una población de 465.891 habitantes y posee 542 camas, con un registro anual de aproximadamente 174.002 estancias (datos del Informe anual de 2011).

4.2. Pacientes

Se incluyeron en el estudio 757 pacientes con nuevo diagnóstico por infección VIH-1 en el Hospital Virgen de la Victoria de Málaga durante el periodo 2004-2015.

4.2.1. Recogida de datos clínicos

Recogimos las características basales de los pacientes incluidos en nuestro estudio de la base de datos de seguimiento prospectivo de los pacientes con infección por el VIH-1 de la Consulta de Infecciosos de nuestro centro. Se incluyeron variables de interés epidemiológico, clínico, microbiológico y farmacológico.

Definición de las variables estudiadas

- 1. Sexo:** codificada como hombres o mujeres.
- 2. Edad:** edad del paciente en el momento del diagnóstico expresada en años.
- 3. Procedencia:** se han considerado:
 - España
 - Resto de Europa
 - América Latina y Caribe

- África
 - Asia
4. **Fecha de infección:** fecha de diagnóstico de la infección por el VIH-1.
 5. **Categoría de transmisión del VIH-1:**
 - Contacto heterosexual
 - Contacto homosexual
 - Usuarios de drogas por vía parenteral
 - Otros/desconocida
 6. **Seroconvertor reciente:** pacientes con infección aguda y aquéllos con una serología negativa en el último año, según criterios del estudio realizado por el Grupo Español Multicéntrico para el Estudio de Seroconvertores (GEMES).
 7. **Carga viral:** expresada en copias/mL y \log_{10} .
 8. **Linfocitos CD4:** expresados en células/ μ L.
 9. **Diagnóstico tardío:** recuento de linfocitos CD4 en el momento del diagnóstico <350 células/ μ L.
 10. **Subtipos VIH-1:** se han codificado los subtipos como:
 - **B**
 - **No B:** incluyendo aquí los subtipos no-B puros (A, C, D, E, F, G, H, K), formas recombinantes circulantes (CRFs) y formas recombinantes únicas (URFs).
 11. **Mutaciones de resistencia a análogos de nucleósidos (Figura 8):** hemos considerado las mutaciones descritas en la literatura para este grupo de fármacos⁷⁶.
 12. **Mutaciones de resistencia a no análogos de nucleósidos (Figura 9):** hemos considerado las mutaciones descritas en la literatura para este grupo de fármacos⁷⁶.

13. Mutaciones de resistencia a inhibidores de proteasa (Figura 10):

hemos considerado las mutaciones descritas en la literatura para este grupo de fármacos⁷⁶.

M	K	D	T	K	L	V	F	Y	F	Q	M	L	T		K
41	65	67	69	70	74	75	77	115	116	151	184	210	215		219
L	R	E/G/N	D	E/R	I/V	A/M/T/S	L	F	Y	M	I/V	W	C/D/E/F/I/N/S/V/Y	E/N/Q/R	
		Ins/del													

Figura 8. Mutaciones presentes en la transcriptasa inversa que confieren resistencia a los fármacos antirretrovirales análogos de nucleósidos.

L	K	K	V	V	Y	Y	G	P	M
100	101	103	106	179	181	188	190	225	230
I	E/P	N/S	A/M	F	C/I/V	C/H/L	A/E/S	H	L

Figura 9. Mutaciones presentes en la transcriptasa inversa que confieren resistencia a los fármacos antirretrovirales no análogos de nucleósidos.

L	<u>L</u>	D	V	M	I	G	I	F	I	G	L	V		N	I	<u>I</u>	N	L
23	24	30	32	46	47	48	50	53	54	73	76	82		83	84	85	88	90
I	<u>I</u>	N	I	I/L	A/V	M/V	<u>L/V</u>	L/Y	A/L/M/S/T/V/A/C/S/T	V/A/C/F/L/M/S/T/A/C/V	D	V	D/S	M				

Figura 10. Mutaciones presentes en la proteasa que confieren resistencia a los fármacos antirretrovirales inhibidores de la proteasa.

Interpretación de la resistencia a los fármacos antirretrovirales:

considerando tres niveles de sensibilidad:

- No evidencia de resistencia.
- Actividad disminuida.
- Resistencia.

4.3. Procesamiento de las muestras

A las muestras de plasma de los pacientes incluidos en el estudio se les realizó:

- **Determinación de la viremia plasmática (carga viral).**
- **Determinación de las mutaciones de resistencia a fármacos antirretrovirales** mediante secuenciación de ácidos nucleicos.
- **Subtipado:** mediante 4 métodos: 3 herramientas automáticas basadas en diferentes criterios: COMET, Geno2pheno y REGA; y análisis filogenético, considerándose este último como la técnica “*gold standard*” para el subtipado.

4.4. Determinación de la viremia plasmática (carga viral).

Para determinar la carga viral empleamos el sistema COBAS® Ampliprep/COBAS® Taqman® HIV-1 Test versión 3.3 (Roche Molecular System) (Figura 11), que lleva a cabo una PCR a tiempo real, amplificando y detectando simultáneamente dos regiones separadas del genoma del VIH-1. Es una técnica altamente sensible con una capacidad de detección desde 20 copias/mL hasta 10 millones de copias/mL. Va a cuantificar el grupo M (subtipos A-H) y el grupo O del VIH-1.

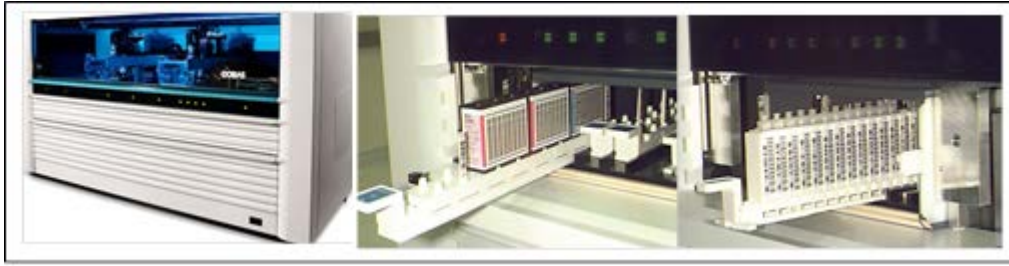


Figura 11. Sistema automatizado COBAS® Ampliprep/COBAS® Taqman®

4.5. Determinación de resistencias a antirretrovirales de VIH-1

Durante los años que comprende el estudio, se han utilizado diferentes técnicas comerciales para la detección de mutaciones de resistencias genotípicas del VIH-1 en la región de la proteasa, en parte de la de la transcriptasa inversa y en la integrasa; concretamente Trugene se utilizó entre 2004-2014 y tanto Abbot como la pirosecuenciación en 2015, utilizando un punto de corte del 1% para interpretar los resultados obtenidos por pirosecuenciación.

4.5.1. TRUGENE HIV-1® (Siemens Diagnostics)

El ensayo de genotipado TRUGENE HIV-1® consta de varias etapas⁷⁷:

- 1. Extracción de la muestra.**
- 2. Transcripción inversa del ARN diana por RT-PCR** mediante el empleo de cebadores (*primers*) específicos del VIH-1.
- 3. Secuenciación de los amplicones** obtenidos en el paso anterior.
- 4. Separación de las reacciones de secuenciación mediante electroforesis** en gel de poliacrilamida y detección por fluorescencia inducida por láser.
- 5. Análisis de las secuencias directa e inversa** usando el software del sistema de secuenciación de ADN, OpenGene® DNA.

1. Extracción de la muestra

La extracción del ácido nucleico se realizó en el sistema automatizado Magnapure[®] de Roche (Figura 12) a partir de 400 μ L de plasma en muestras con carga viral >1000 copias/mL ó de 500 μ L en aquéllas con cargas virales más bajas. Una vez extraído, el ácido nucleico se conservó a -80°C hasta su procesamiento.



Figura 12. Sistema automatizado Magnapure[®] de Roche

2. Transcripción inversa y amplificación por PCR

Las muestras de ARN extraídas se añadieron a unos tubos de reacción en los que tuvo lugar la transcripción inversa y la amplificación por PCR (Figura 13). Para ello se empleó una ADN polimerasa termoestable y una mezcla de varios cebadores dirigidos a las variantes virales más frecuentes.

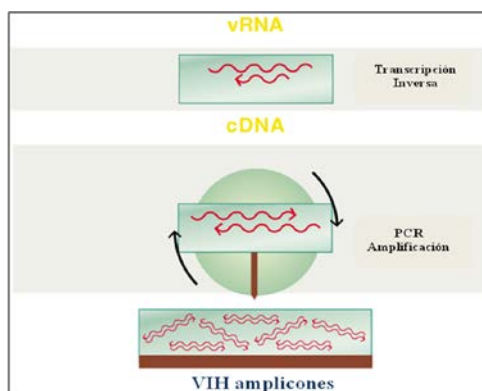


Figura 13. Proceso de retrotranscripción

3. Reacción de secuenciación

Ambas hebras del ADN bicatenario se secuenciaron al mismo tiempo en un tubo de reacción, conteniendo dos o más cebadores directos (codificantes) e inversos (no codificantes), marcados con un colorante fluorescente diferente.

4. Electroforesis de los productos de la reacción de secuenciación

Una vez finalizada la reacción de secuenciación, cargamos una fracción de cada reacción en la parte superior de un casete MicroCel™ 500, contiendo un gel de poliacrilamida polimerizado ultra fino vertical con una matriz de un tamaño de poros específico. Cerca de la parte inferior del gel, una serie de detectores medirán la cantidad de luz y la longitud de onda producidos por el colorante fluorescente. Se requieren cuatro carriles para cada reacción de secuenciación, uno para cada uno de los cuatro di-desoxinucleótidos de terminación de cadena (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP).

5. Análisis de los datos

Para el análisis de los datos se combinaron las secuencias directa e inversa y se compararon con la secuencia del VIH-1_{LAV-1}, utilizando el software que proporciona la casa comercial.

El resultado final para cada muestra es la creación de un informe de mutaciones y la interpretación de las resistencias siguiendo los criterios de las guías más actualizadas.

4.5.2. ViroSeq® VIH-1 Genotyping System v2.0

El sistema ViroSeq VIH-1 también permite la detección de mutaciones genómicas del virus del VIH-1 que confieren resistencia a diferentes tipos de fármacos antirretrovirales. La detección se hace en muestras de plasma recogidas en EDTA, teniendo en cuenta todo el gen de la proteasa (a partir de los codones 1-99) y dos tercios del gen de la transcriptasa inversa (RT) (codones 1-335), como podemos observar en la Figura 14.

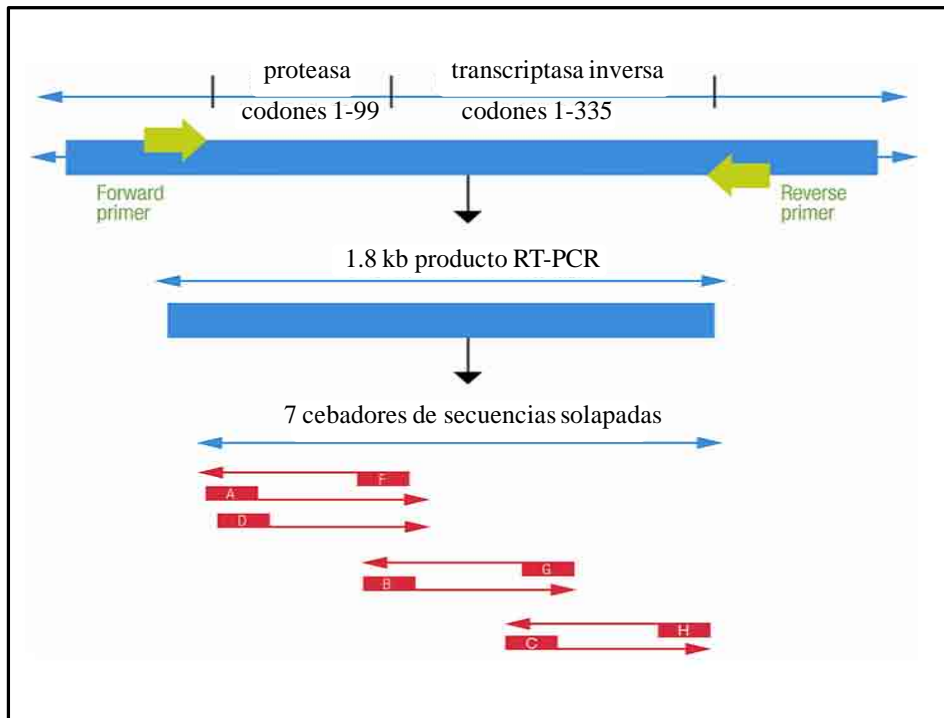


Figura 14. Esquema de amplificación del gen *pol* y secuenciación del amplicón. Imagen extraída de la web comercial (<https://www.abbottmolecular.com>)

El proceso de genotipificación utilizando **ViroSeq** consta de varias etapas:

- Aislamiento de las partículas de VIH-1 a partir de muestras de plasma, seguido de la purificación del ARN viral.
- Transcripción inversa del genoma de VIH-1 y amplificación por PCR
- Secuenciación directa del producto de amplificación por PCR utilizando siete *primers*.
- Identificación de mutaciones en la proteasa o en la RT utilizando el software de genotipado del sistema.

4.5.3. Pirosecuenciación mediante el sistema Junior 454-S Roche Molecular®

La tecnología 454 está basada en la técnica de pirosecuenciación y es comercializada por la empresa Roche (Figura 15). Esta metodología fue desarrollada por Mustafá Ronaghi⁷⁸ e involucra la lectura de información nucleotídica a partir de síntesis enzimática.



Figura 15. GS Junior System®

La pirosecuenciación o secuenciación 454, de 454 Life Sciences, es un método de secuenciación de ADN basado en la monitorización a tiempo real de la síntesis de ADN. Se diferencia del método de secuenciación tradicional de Sanger en que la señal que se detecta es la de liberación de pirofosfato (PPi) cuando se incorporan los nucleótidos y que todos los pasos se realizan “*in vitro*”⁷⁹.

El método podemos dividirlo en 3 etapas fundamentales⁸⁰:

1. Preparación de la librería de ADN

La preparación de la librería de ADN consiste en el fraccionamiento del ADN genómico (ADNg) en pequeños fragmentos de 300 a 500 pares de bases. La librería molde de ADN de hebra sencilla se analiza para valorar su calidad y

mediante titulación se determina la proporción óptima (moléculas de ADN: perlas) necesaria para la PCR en emulsión (emPCR).

2. Amplificación clonal mediante PCR en emulsión

Las moléculas de ADN de hebra sencilla flanqueados por los oligonucleótidos A y B son capturados por microesferas conteniendo oligonucleótido anti-B. Luego, son emulsionados en una mezcla de solución acuosa (mix de PCR) y aceite. Finalmente, se realiza un ciclado térmico para multiplicar los ADN contenidos en cada microesfera. El resultado será una perla inmobilizada conteniendo fragmentos de ADN amplificados clonalmente.

3. Secuenciación

Las perlas unidas a los fragmentos de la librería molde de ADN de hebra sencilla se añaden al ADN Bead Incubation Mix, que contiene ADN polimerasa, y se distribuyen en capas dentro de una microplaca junto con unas perlas enzimáticas que contienen luciferasa y sulfurilasa.

Cuando la microplaca está correctamente cargada se coloca en el equipo donde los reactivos de secuenciación (tampones y nucleótidos) fluirán a través de los pocillos de la placa (Figura 16).

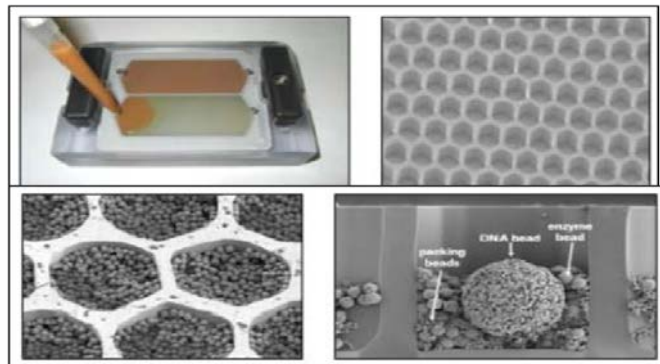


Figura 16. Detalle de las celdas de la microplaca conteniendo las esferas. Imagen extraída de <https://lifescience.roche.com>

La adición de uno (o más) nucleótido(s) resulta en una reacción que genera una señal de luz que es recogida por la cámara CCD del equipo. La intensidad de la señal es proporcional al número de nucleótidos incorporados en un solo flujo de nucleótidos.

4. Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados se realizó con la plataforma informática Deep-Check, que aporta información de las mutaciones de resistencia presentes al 1%, 5%, 10% y 20% y la interpretación de las resistencias. La sensibilidad de la tecnología de pirosecuenciación es la diferencia fundamental con la secuenciación Sanger que informa de la población mutada existente a partir de un 10-20% .

4.6. Subtipado y análisis de CT

Se determinó el subtipo del VIH-1 de cada paciente incluido en el estudio. Para ello se emplearon 4 herramientas diferentes: 3 herramientas automáticas (COMET, Geno2pheno y REGA), a las cuáles podemos tener acceso a través de internet; y un análisis filogenético de las secuencias en estudio, considerándose este último método como la técnica de referencia o “*gold standard*” para el subtipado.

4.6.1. COMET (*CO*ntext-based *MO*deling for *EX*peditious *TY*ping)

La herramienta de subtipado COMET se basa en la construcción de modelos de Markov sobre las frecuencias de nucleótidos para cada conjunto de secuencias de referencia. El algoritmo de COMET utiliza estos modelos de Markov para calcular una matriz que da la probabilidad de cada subtipo de referencia (fila) en cada posición de la secuencia (columna). Para un modelo dado y una secuencia de consulta, el modelo selecciona para cada base de la consulta, la base con la mejor exactitud⁸¹.

COMET está disponible gratuitamente a través de una interfaz en la web <http://comet.retrovirology.lu> , y para uso académico como un archivo .jar de Java.

4.6.2. Geno2pheno versión 3.4

Es uno de los algoritmos de interpretación de más amplia difusión que podemos encontrar como técnica de subtipado automático, disponible en la red (<http://hcv.geno2pheno.org>). Se ha desarrollado conjuntamente entre la Universidad de Colonia y el Instituto Max-Planck de Alemania.

Se basa en un método estadístico que utiliza en sus predicciones el SVM (*Support Vector Machine*)⁸². Geno2pheno puede realizar las predicciones tanto a partir de la secuencia FASTA de nucleótidos como de aminoácidos de la región V3. Tras la presentación de una secuencia problema en la plataforma web, mediante cálculos de similaridad con respecto a secuencias de referencia, la herramienta es capaz de determinar el subtipo de nuestra secuencia.

4.6.3. REGA versión 3.0

Esta herramienta emplea criterios filogenéticos con el fin de identificar el subtipo de una secuencia específica. Fue desarrollada por Oliveira y colaboradores⁸³, en el marco del Programa de Patogénesis e Immunoterapia VIH-1 de la Universidad de Pretoria (Sudáfrica), y con la participación del Instituto REGA de la Universidad Católica de Lovaina, Bélgica. <http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/>.

El proceso consta de varios pasos:

- Construcción de una alineación principal de la secuencia de consulta con las cepas de referencia de los distintos subtipos puros y formas recombinantes circulantes (CRFs).
- El segundo paso consiste en la construcción de un árbol filogenético utilizando el método de la distancia HKY con el software PAUP.
- A continuación, las secuencias con un tamaño mayor a 800 pares de bases (bps) son sometidas a un análisis de recombinación usando

un programa de *bootscanning* y una ventana deslizante de 400 pbs en movimiento en pasos de 40 bps.

- En el caso de las secuencias con un tamaño menor a 800 bps se examina la alineación para determinar si contiene suficientes señales filogenéticas que permitan determinar el subtipo. En este caso el software utilizado es TREEPUZZLE.

La herramienta de subtipado REGA tiene la gran ventaja con respecto a Geno2pheno, de que es capaz de manejar hasta 1000 secuencias FASTAs a la vez, lo cual facilita el trabajo para grandes conjuntos de datos.

4.6.4. Análisis filogenético *ad hoc*

Para realizar el análisis filogenético de las 757 secuencias de los pacientes incluidos en nuestro estudio, se empleó la secuencia de la proteasa concatenada con la de la retrotranscriptasa⁸⁴⁻⁸⁷, de acuerdo a la diversa bibliografía consultada. Según el objetivo fuera el subtipado o el análisis de CT, la metodología variaba ligeramente (Figura 17), pero los primeros pasos fueron comunes en ambos casos:

- En primer lugar se llevó a cabo un alineamiento de las secuencias sin considerar la pauta de codones con el programa Clustal X⁸⁸, siendo a continuación editado o curado manualmente así como de forma automática con el programa Gblocks⁸⁹.
- Una vez obtenido un alineamiento de calidad, se determinó el modelo de evolución nucleotídica más probable que se podía deducir a partir de él. Para ello empleamos el módulo FindModel integrado en el software MEGA versión 6.06⁹⁰.

Como se ha comentado, los pasos siguientes variaron según el objetivo perseguido:

Subtipado

- Además de nuestras 757 secuencias, incluimos al menos dos secuencias de referencia por cada subtipo y CRF conocido.

- Estas secuencias de referencias fueron proporcionadas por la Base de Datos del Laboratorio Nacional de Los Alamos (disponible en: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html>) . En total nuestro archivo contenía 937 secuencias y 915 posiciones eliminando los gaps del alineamiento.
- La reconstrucción filogenética fue inferida por el método de Máxima verosimilitud (*Maximum likelihood*) mediante el programa FastTree⁹¹⁻⁹², a través de la plataforma CIPRES⁹³.
- Consideramos el valor más bajo obtenido para el criterio Akaike para describir el mejor patrón de sustitución, que fue en nuestro caso GTR+G+I.
- La consistencia de una determinada relación filogenética (clado) se evaluó por el valor de “*bootstrap*” o remuestreo de dicha agrupación (en base a 1.000 réplicas), asignándose una secuencia a un determinado subtipo o forma recombinante si dicho valor era igual o superior al 70%, de acuerdo a la bibliografía consultada para el objetivo perseguido en este apartado⁹⁴.
- Finalmente, las secuencias que no pudieron asociarse a un subtipo puro o CRF determinados por no relacionarse filogenéticamente de forma consistente con ninguno de ellos (valores de *bootstrap* menores al 70%) fueron analizadas con el programa Simplot para encontrar señales de recombinación⁹⁵.

Análisis de CT

- Basándonos en la bibliografía descrita⁹⁶, usando el programa MEGA v6.06 realizamos un análisis filogenético preliminar mediante el método *Neighbor Joining* (NJ) con las 757 secuencias de nuestro estudio. El modelo empleado fue Kimura 2-parameter model y distribución gamma con valor por defecto.

- Tomando como partida este árbol de NJ, eliminamos todas aquellas secuencias que formaban parte de ramas con valores de *bootstrap* menores al 80%, quedándonos así con 451 secuencias, las cuales volvimos a alinear.
- Tanto este nuevo alineamiento como el previo realizado con las 757 secuencias, constaba de 918 posiciones tras la eliminación de los gaps.
- Finalmente, para analizar las CT, con el alineamiento de las 451 secuencias, reconstruimos una filogenia por el método de *Maximum likelihood* con FastTree a través de CIPRES⁹⁴. En este caso el modelo evolutivo empleado fue también GTR+G+I.
- Con el objetivo de describir las diferentes CT encontradas en nuestro estudio, éstas fueron caracterizadas en base a diferentes variables de interés clínico, epidemiológico y virológico:
 - Fecha de nacimiento
 - Año de diagnóstico de VIH-1
 - País de nacimiento
 - Sexo
 - Mecanismo de transmisión de VIH-1
 - Seroconvertores
 - Diagnóstico tardío
 - Evento SIDA
 - Linfocitos CD4
 - Carga viral
 - Subtipo
 - Mutaciones de resistencia

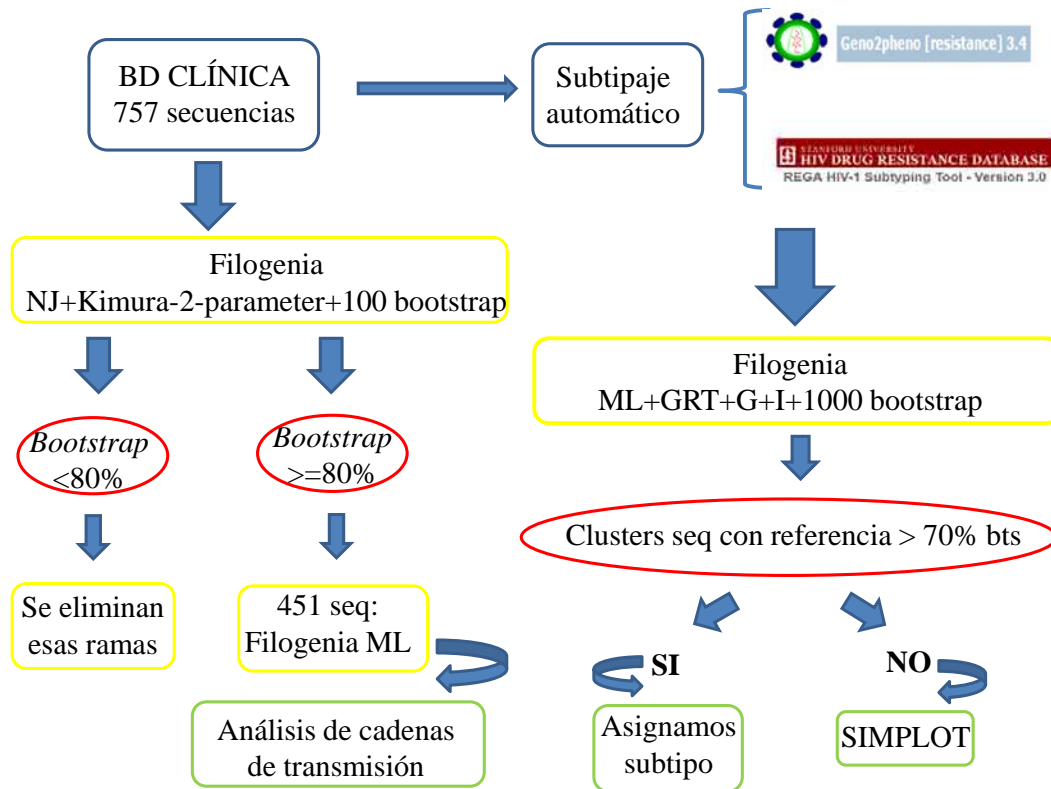


Figura 17. Diagrama resumen del flujo de trabajo para el subtipado y el análisis de las cadenas de transmisión

4.6.5. Evaluación estadística de las distintas herramientas de subtipado

Se basó en los valores de sensibilidad y especificidad y fueron obtenidos usando la calculadora disponible en el siguiente enlace: http://www.hrc.es/investigacion/bioest/otras_calculadoras.html. Para llevar a cabo dichas medidas, se definió la sensibilidad como el número de positivos verdaderos / (número de positivos verdaderos + número de falsos negativos), mientras que la especificidad fue definida como el número de negativos verdaderos / (número de negativos verdaderos + número de falsos positivos). Por su parte, se consideraron para cada herramienta como positivo y negativo verdadero, al número de secuencias que de forma concordante al análisis filogenético, que fue considerado

como la técnica *gold standard* para el subtipado, eran asignadas al mismo subtipo en concreto o dejadas sin asignar a él, respectivamente. Por el contrario, tanto los falsos positivos como los negativos venían a reflejar los resultados discordantes de cada herramienta automática con respecto a la filogenia; un falso positivo sería la secuencia incorrectamente asignada al subtipo en estudio por la herramienta, mientras que el falso negativo representaba toda secuencia que no era asignada al subtipo considerado cuando debía de haberse hecho.

Las medidas de sensibilidad y especificidad fueron obtenidas de forma global para el subtipo B y no-B, así como de forma específica para las CRFs más prevalentes en nuestra cohorte, de acuerdo a los resultados del análisis filogenético. Esto nos permitirá determinar qué herramienta automatizada puede ser más eficiente para discriminar entre los principales subtipos de nuestra cohorte.

4.7. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se elaboró una base de datos en la que se incluyeron las variables descritas en el **apartado 4.2.1** de esta misma sección. Se empleó el paquete estadístico del programa SPSS[®] para Windows versión 16.1 (Statistical Program for Social Science).

4.7.1. Análisis descriptivo

Se realizó un análisis descriptivo de las variables incluidas en el estudio. Las variables numéricas se resumieron con medianas e IQR; mientras que las variables cualitativas se expresaron mediante frecuencias y porcentajes.

4.7.2. Análisis bivalente

Para ver si la relación que existía entre dos variables de tipo cualitativo era consistente o no, se construyeron tablas de contingencias y se aplicó el test de Chi-cuadrado o test exacto de Fisher.

Para valorar la relación entre una variable cualitativa dicotómica y una cuantitativa, se realizó el test de la t de Student. En el caso de no cumplirse la igualdad de varianzas, se realizó la t de Student con la corrección de Welch. En caso de no cumplirse el requisito de normalidad se realizó la prueba de U-Mann Withney.

4.8. Aspectos éticos

El proyecto fue presentado al Comité de Ética y de Investigación Provincial de Málaga y se incluyó en el Portal de Ética de la Investigación Biomédica de Andalucía (PEIBA).

El estudio fue realizado siguiendo las Guías de Buenas Prácticas Clínicas y la Declaración de Helsinki (Fortaleza, Brasil 2013) garantizando la confidencialidad de los datos según la Ley Orgánica de Protección de datos de carácter personal 15/1999. En este sentido, los datos que pudieran identificar a los pacientes, se mantuvieron de forma separada utilizándose un código interno a la hora de incluirlos en nuestra base de datos.

Toda la información fue utilizada únicamente con el fin de elaborar esta Tesis Doctoral.

5. RESULTADOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

5. RESULTADOS

5.1. Características basales de los pacientes

De los 784 pacientes diagnosticados de VIH-1 en el Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga en el periodo 2004-2015 se pudieron incluir 757 que tenían datos suficientes y un estudio de resistencia basal. El 88,2% eran varones, con una edad media de 42 años (IQR: 34-50). La media de linfocitos CD4 al diagnóstico fue de 372 células/ μ L (161-530) y de carga viral 4,8 log (4,3-5,3). Un 25,5% tenía serología previa negativa, con un tiempo medio de seroconversión de 22,7 meses (7,7-27,5). El 49,1% cumplía criterios de diagnóstico tardío y el 19,8% presentó un evento SIDA.

La principal vía de transmisión del VIH-1 fue la sexual (96,1%), destacando la transmisión HSH (70,7%). El 73,5% de los pacientes era de origen español y el resto procedía mayoritariamente de América latina, otros países de Europa y África.

Con objeto de evaluar el cambio de tendencia a lo largo del periodo de estudio, se dividió éste en dos intervalos de tiempo similares: **Periodo A**, entre 2004-2009 y **Periodo B**, entre 2010-2015.

En la Figura 18 podemos observar la distribución de los pacientes incluidos en el estudio según el año de diagnóstico. Las características basales, así como el contraste entre los pacientes de ambos periodos, se muestran en la Tabla 5.

Resultados

Tabla 5. Características basales de los pacientes (N=757)

		Cohorte (2004-2015) N=757	Periodo A (2004-2009) N=341	Periodo B (2010-2015) N=416	<i>p</i>
Sexo	Hombre	668 (88,2)	290 (85,0)	378 (90,9)	0,013
	Mujer	89 (11,2)	51 (15,0)	38 (9,1)	
Edad (años)		42 (34-50)	46 (38-53)	39 (31-46)	0,473
Linfocitos CD4 (células/μL)		353 (161-530)	321 (114-504)	371 (198-541)	0,781
CV (log n° copias/mL)		4,8 (4,4-5,4)	4,9 (4,4-5,5)	4,8 (4,3-5,2)	0,294
Origen	Español	557 (73,6)	238 (69,8)	319 (76,7)	0,032
	Inmigrante	200 (26,4)	103 (30,2)	97 (23,4)	
Procedencia	España	557 (73,6)	238 (69,8)	319 (76,7)	0,001
	Sudamérica	86 (11,4)	35 (10,3)	51 (12,3)	
	Otros países de Europa	65 (8,6)	36 (10,6)	29 (7,0)	
	África	46 (6,1)	32 (9,4)	14 (3,4)	
	Asia	3 (0,4)	0 (0)	3 (0,7)	
Categoría de transmisión	HSH	535 (70,7)	214 (62,8)	321 (77,2)	<0,001
	HTX	192 (25,4)	105 (30,8)	87 (20,9)	
	UDVP	18 (2,4)	14 (4,1)	4 (1,0)	
	Otros	12 (1,6)	8 (2,3)	4 (1,0)	
SIDA		150 (19,8)	89 (26,1)	61 (14,7)	<0,001
Diagnóstico tardío		372 (49,1)	180 (52,8)	192 (46,2)	0,069
Seroconvertores recientes*		193 (25,5)	34 (10,0)	159 (38,2)	<0,001
Tiempo de seroconversión (meses)		14,8 (7,8-27,5)	9,5 (5,3-12,8)	17,5 (9,3-33,6)	<0,001

Las variables cuantitativas se expresan como media o mediana (según sigan o no una distribución normal) e IQR (rango intercuartílico), y las cualitativas como n (%)

*Serología previa negativa en el último año

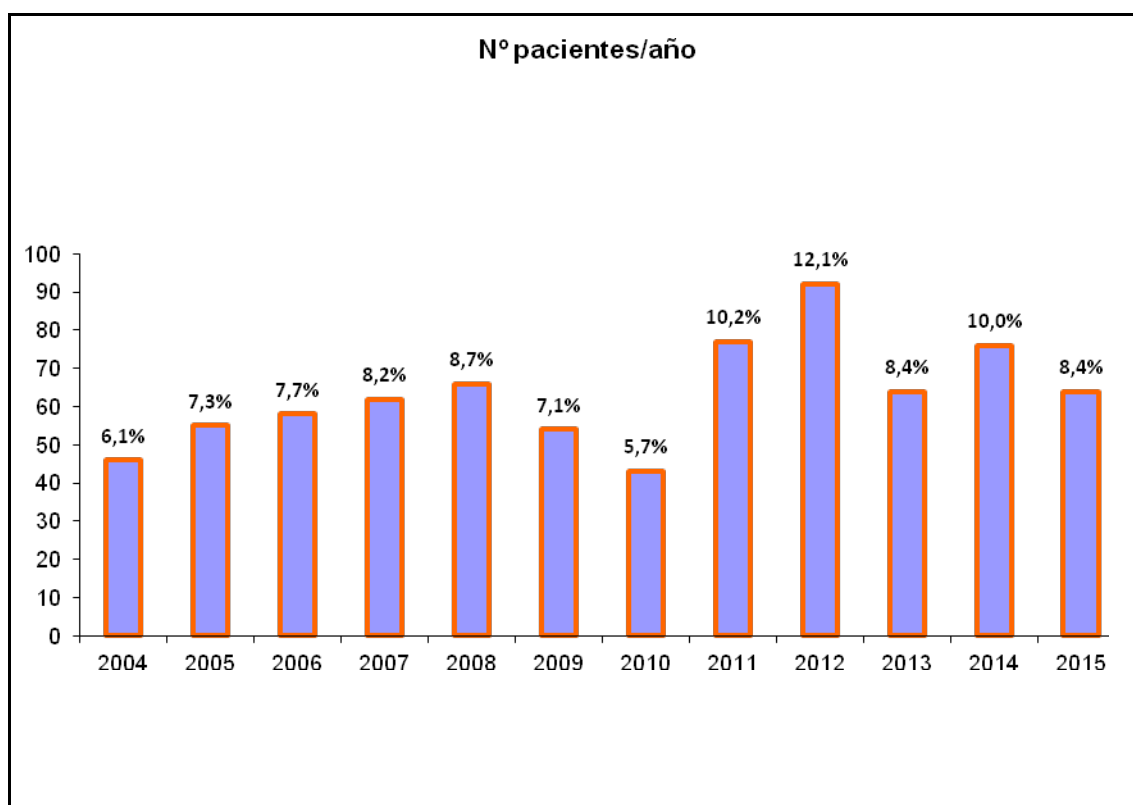


Figura 18. Distribución de los pacientes incluidos en el estudio según el año de diagnóstico

5.2. Frecuencia de las mutaciones de resistencia

Se estudiaron las mutaciones de resistencia a 3 familias de antirretrovirales: ITIAN, ITINN e IP. Ciento ochenta y cuatro (24,3%), portaban el virus con alguna mutación de resistencia. En la Tabla 6, se muestran las mutaciones por familia de fármacos antirretrovirales.

Respecto a los ITIAN, destacamos las mutaciones T69D/N (7,3%), K219E/Q (4,4%), D67NR (4,2%) y T215Rev (3,8%). Para los ITINN, las mutaciones más frecuentes fueron V179D/E (5,9%), K103N/S (4,6%) y G190A/S (2,9%). Finalmente, en los IP observamos una mayor frecuencia de M46I/L (2,0%) y L90M (0,5%).

Resultados

Tabla 6. Mutaciones de resistencia a fármacos antirretrovirales

Mutaciones ITIAN	Mutaciones ITINN		Mutaciones IP		
n (%)	n (%)		n (%)		
Total	174 (23,0)	132 (17,4)	31 (4,1)		
M41L	8 (1,1)	L100I	1 (0,1)	L24I	1 (0,1)
K65R	1 (0,1)	K101E	3 (0,4)	V32I	1 (0,1)
D67N	32 (4,2)	K103N/S	35 (4,6)	M46I/L	15 (2,0)
T69D/N	55 (7,3)	V106A	16 (2,1)	I47A/V	1 (0,1)
K70E	1 (0,1)	V179D/E	45 (5,9)	I50V	1 (0,1)
K70R	2 (0,3)	Y181I/C	5 (0,7)	F53L	4 (0,5)
L74V	1 (0,1)	Y188L	1 (0,1)	I54L/M	3 (0,4)
M184I/V	6 (0,8)	G190A/S	22 (2,9)	V82L	1 (0,1)
L210W	3 (0,4)	P225H	4 (0,5)	L90M	4 (0,5)
T215Rev*	29 (3,8)				
T215F	2 (0,3)				
T215Y	1 (0,1)				
K219E/Q	33 (4,4)				

ITIAN: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos; ITINN: inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos; IP: inhibidores de la proteasa

*Mutaciones de reversión=D/I/S/V

Resultados

En las Tablas 7, 8 y 9 se presentan las mutaciones para cada familia de antirretrovirales en función del periodo estudiado, A ó B.

Tabla 7. Mutaciones de resistencia a ITIAN

Mutación	Periodo A (N= 72) n (%)	Periodo B (N= 112) n (%)	<i>p</i>
M41L	7 (9,7)	1 (0,9)	0,015
K65R	1 (1,4)	0 (0,0)	0,269
D67N	8 (11,1)	24 (21,4)	0,020
T69D/N	15 (20,8)	40 (35,7)	0,006
K70E	1 (1,4)	0 (0,0)	0,269
K70R	2 (2,8)	0 (0,0)	0,118
L74V	1 (1,4)	0 (0,0)	0,269
M184I/V	6 (8,3)	0 (0,0)	0,007
L210W	2 (2,8)	1 (0,9)	0,451
T215D/I/S/V	10 (13,9)	19 (16,9)	0,260
T215F	2 (2,8)	0 (0,0)	0,118
T215Y	1 (1,4)	0 (0,0)	0,269
K219E/Q	5 (6,9)	28 (25,0)	<0,001

ITIAN: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos

Tabla 8. Mutaciones de resistencia a ITINN

Mutación	Periodo A (N= 72) n (%)	Periodo B (N= 112) n (%)	<i>p</i>
L100I	1 (1,4)	0 (0,0)	0,269
K101E	2 (2,8)	1 (0,9)	0,451
K103N	18 (25,0)	16 (14,3)	0,344
V106A	4 (5,6)	12 (10,7)	0,103
V179D/E	16 (22,2)	29 (25,9)	0,187
Y181I/C	3 (4,2)	2 (1,8)	0,500
Y188L	1 (1,4)	0 (0,0)	0,269
G190A/S	4 (5,6)	18 (16,1)	0,010
P225H	4 (5,6)	0 (0,0)	0,027

ITINN: inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos

Resultados

Tabla 9. Mutaciones de resistencia a IP

Mutación	Periodo A (N= 41) n (%)	Periodo B (N= 77) n (%)	<i>p</i>
L24I	1 (1,4)	0 (0,0)	0,269
V32I	1 (1,4)	0 (0,0)	0,269
M46I/L	9 (12,5)	6 (5,3)	0,240
I47A/V	1 (1,4)	0 (0,0)	0,269
I50V	1 (1,4)	0 (0,0)	0,269
F53L	4 (5,6)	0 (0,0)	0,027
I54L/M	3 (4,2)	0 (0,0)	0,055
V82L	1 (1,4)	0 (0,0)	0,269
L90M	4 (5,6)	0 (0,0)	0,027

IP: inhibidores de la proteasa

5.3. Prevalencia de resistencias

De los 757 pacientes incluidos en el estudio, 118 portaban virus con resistencia a los fármacos antirretrovirales, lo que implica una prevalencia de resistencias primarias del 15,6%.

La prevalencia fue mayor en el periodo B que en el A (18,5% vs. 12,0%; $p=0,014$). En la Tabla 10 y en la Figura 19 podemos observar la prevalencia de resistencias globales y para cada familia de antirretrovirales en los dos periodos.

Tabla 10. Prevalencia de resistencia a fármacos antirretrovirales

	Total N= 757 n (%)	Periodo A N=341 n (%)	Periodo B N=416 n (%)	<i>p</i>
ITIAN	38 (5,0)	14 (4,1)	24 (5,8)	0,297
ITINN	77 (10,1)	29 (8,5)	48 (11,5)	0,169
IP	17 (2,2)	10 (2,9)	7 (1,7)	0,248
Total	118 (15,6)	41 (12)	77 (18,5)	0,014

ITIAN: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos; ITINN: inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos; IP: inhibidores de la proteasa

Resultados

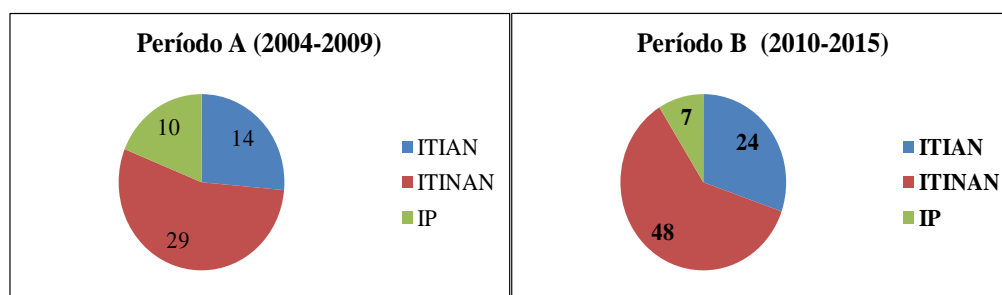


Figura 19. Prevalencia de las mutaciones de resistencia para cada familia de antirretrovirales en ambos periodos

En cuanto a la presencia de multiresistencia, el 6,7% presentó resistencia a dos familias y el 2,5% a las 3 familias, con similar distribución por periodos (Tabla 11).

Tabla 11. Prevalencia de multiresistencia en los dos periodos de estudio

Resistencia	Total N=118 n (%)	Periodo A N=41 n (%)	Periodo B N=77 n (%)	<i>p</i>
Una familia	107 (90,6)	32 (78,0)	75 (97,4)	0,001
Dos familias	8 (6,7)	6 (1,7)	2 (0,5)	0,087
Tres familias	3 (2,5)	3 (0,9)	0 (0,0)	0,055

En la Figura 20 podemos observar la evolución de la prevalencia de resistencias primarias por familia de antirretrovirales durante los años del estudio.

Prevalencia de resistencias

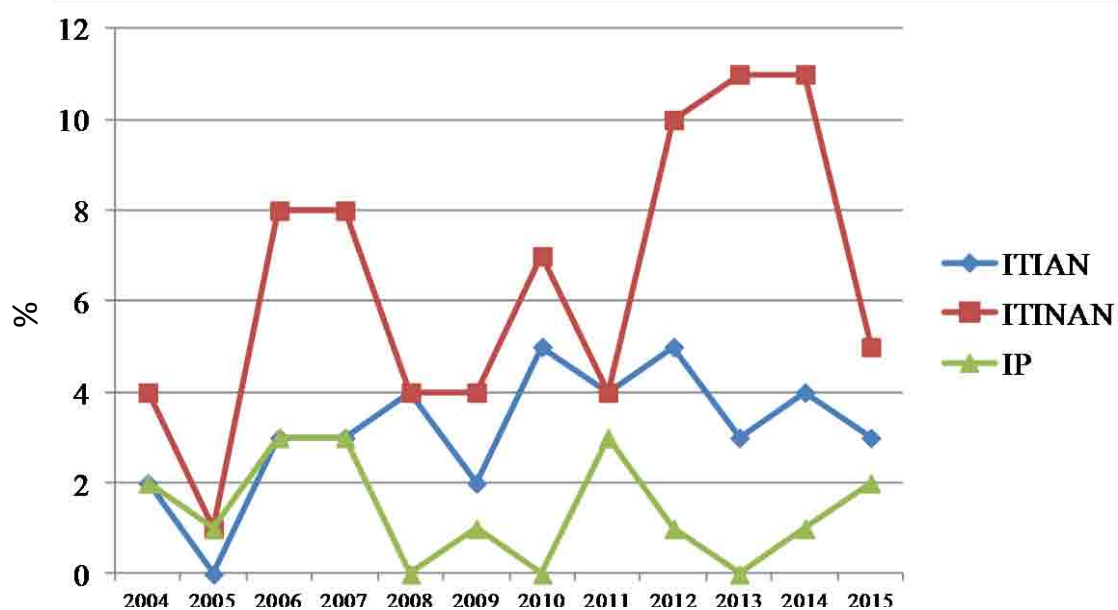


Figura 20. Prevalencia de resistencias por familia de antirretrovirales entre los años 2004 a 2015

En las Tablas 12 y 13 se presenta el contraste de las características basales entre los pacientes que presentaban cepas virales con y sin resistencias primarias, en el total de la muestra (Tabla 12) y por periodos (Tabla 13).

Resultados

Tabla 12. Características basales de los pacientes que presentaban cepas virales con o sin resistencias primarias

		Resistencias primarias		<i>p</i>
		No N=639	Sí N=118	
Sexo	Hombre	561 (87,8)	107 (90,7)	0,371
	Mujer	78 (12,2)	11 (9,3)	
Edad (años)		43 (34-50)	41 (33-49)	0,473
Linfocitos CD4 (células/μL)		371 (160-525)	381 (192-544)	0,223
Carga viral (log n° copias/mL)		4,8 (4,4-5,4)	4,7 (4,2-5,3)	0,375
Origen	Español	465 (72,8)	92 (77,9)	0,240
	Inmigrante	174 (27,2)	26 (22,1)	
Procedencia	España	465 (72,8)	92 (77,9)	0,771
	Sudamérica	75 (11,7)	11 (9,3)	
	Otros países de Europa	56 (8,8)	9 (7,6)	
	África	40 (6,3)	6 (5,1)	
	Asia	3 (0,5)	0 (0,0)	
Categoría de transmisión	UDVP	17 (2,7)	1 (0,8)	0,227
	HSH	443 (69,3)	92 (78,0)	
	HTX	169 (26,4)	23 (19,5)	
	Otro	10 (1,6)	2 (1,7)	
SIDA		128 (20,0)	22 (18,6)	0,728
Diagnóstico tardío		320 (50,1)	52 (44,1)	0,230
Seroconvertores recientes*		151 (23,6)	42 (35,6)	0,006
Tiempo de seroconversión (meses)		15,3 (7,4-28,9)	14,2 (9,3-24,1)	0,491

Las variables cuantitativas se expresan como media o mediana (según sigan o no una distribución normal) e IQR (rango intercuartílico), y las cualitativas como n (%)

*Serología previa negativa en el último año

Resultados

Tabla 13. Características basales de los pacientes que presentaban cepas virales con o sin resistencias primarias en los dos periodos de tiempo estudiados

Resistencias Primarias		Periodo A			Periodo B		
		No N=300	Sí N=41	<i>p</i>	No N=339	Sí N=77	<i>p</i>
Sexo	Hombre	257 (85,7)	33 (80,5)	0,383	304 (89,7)	74 (96,1)	0,077
	Mujer	43 (14,3)	8 (19,5)		35 (10,3)	3 (3,9)	
Edad (años)		46 (38-53)	46 (38-54)	0,475	39 (31-47)	39 (30-46)	0,463
Linfocitos CD4 (células/μL)		344 (114-481)	348 (103-565)	0,163	394 (191-544)	399 (255-534)	0,507
CV (log n° copias/mL)		4,9 (4,4-5,5)	4,7 (4,2-5,3)	0,415	4,8 (4,4-5,2)	4,7 (4,2-5,2)	0,436
Origen	Español	208 (69,3)	30 (73,2)	0,616	257 (75,8)	62 (80,5)	0,378
	Inmigrante	92 (30,7)	11 (26,8)		82 (24,2)	15 (19,5)	
Procedencia	España	208 (69,3)	30 (73,2)	0,723	257 (75,8)	62 (80,5)	0,658
	Sudamérica	32 (10,7)	3 (7,3)		43 (12,7)	8 (10,4)	
	Otros países de Europa	33 (11,0)	3 (7,3)		23 (6,8)	6 (7,8)	
	África	27 (9,0)	5 (12,2)		13 (3,8)	1 (1,3)	
	Asia	0 (0,0)	0 (0,0)		3 (0,9)	0 (0,0)	
Categoría de transmisión	UDVP	14 (4,7)	0 (0,0)	0,573	3 (0,9)	1 (1,3)	0,295
	HSH	187 (62,3)	27 (65,8)		256 (75,5)	65 (84,4)	
	HTX	92 (30,7)	13 (31,7)		77 (22,7)	10 (13,0)	
	Otro	7 (2,3)	1 (2,4)		3 (0,9)	1 (1,3)	
SIDA		77 (25,7)	12 (29,3)	0,622	51 (15,0)	10 (13,0)	0,645
Diagnóstico tardío		160 (53,3)	20 (48,2)	0,584	160 (47,2)	32 (41,6)	0,370
Seroconvertidores recientes*		29 (9,7)	5 (12,2)	0,612	122 (36,0)	37 (48,0)	0,049
Tiempo de seroconversión (meses)		9,5 (6,7-12,0)	8,9 (2,8-15,9)	0,361	18,9 (8,4-34,7)	14,8 (10,9-27,5)	0,449

Las variables cuantitativas se expresan como media o mediana (según sigan o no una distribución normal) e IQR (rango intercuartílico), y las cualitativas como n (%)

*Serología previa negativa en el último año

Resultados

En las Tablas 14, 15 y 16 analizamos las características basales de los pacientes que presentaban cepas virales con y sin resistencias primarias a las diferentes familias de antirretrovirales: ITIAN, ITINN e IP.

Tabla 14. Características basales de los pacientes que presentaban cepas virales con o sin resistencias primarias a ITIAN

		Resistencias primarias a ITIAN		<i>p</i>
		No N=719	Sí N=38	
Sexo	Hombre	634 (88,2)	34 (89,5)	0,809
	Mujer	85 (11,8)	4 (10,5)	
Edad (años)		42 (33-50)	45 (35-51)	0,473
Linfocitos CD4 (células/μL)		373 (163-525)	350 (64-544)	0,093
CV (log n^o copias/mL)		4,8 (4,4-5,4)	4,6 (4,0-5,3)	0,366
Origen	Español	530 (73,7)	27 (71,1)	0,717
	Inmigrante	189 (26,3)	11 (28,9)	
Procedencia	España	530 (73,7)	27 (71,1)	0,437
	Sudamérica	84 (11,7)	2 (5,3)	
	Otros países de Europa	60 (8,3)	5 (13,1)	
	África	42 (5,8)	4 (10,5)	
	Asia	3 (0,4)	0 (0,0)	
Categoría de transmisión	UDVP	17 (2,4)	1 (2,6)	0,267
	HSH	511 (71,0)	24 (63,2)	
	HTX	181 (25,2)	11 (28,9)	
	Otro	10 (1,4)	2 (5,3)	
SIDA		139 (19,3)	11 (28,9)	0,147
Diagnóstico tardío		354 (48,7)	18 (47,4)	0,823
Seroconvertedores recientes*		180 (25,0)	13 (34,2)	0,206
Tiempo de seroconversión (meses)		14,8 (7,7-27,6)	20,8 (10,0-27,6)	0,482

Las variables cuantitativas se expresan como media o mediana (según sigan o no una distribución normal) e IQR (rango intercuartílico), y las cualitativas como n (%)

*Serología previa negativa en el último año

Resultados

Tabla 15. Características basales de los pacientes que presentaban cepas virales con o sin resistencias primarias a ITINN

		Resistencias primarias a ITINN		<i>p</i>
		No N=680	Sí N=77	
Sexo	Hombre	599 (88,1)	69 (89,6)	0,694
	Mujer	81 (11,9)	8 (10,4)	
Edad (años)		43 (34-50)	41 (33-48)	0,473
Linfocitos CD4 (células/μL)		374 (160-536)	358 (183-500)	0,473
CV (log n° copias/mL)		4,8 (4,3-5,4)	4,8 (4,3-5,3)	0,482
Origen	Español	498 (73,2)	59 (76,6)	0,523
	Inmigrante	182 (26,8)	18 (23,4)	
Procedencia	España	498 (73,2)	59 (76,6)	0,921
	Sudamérica	79 (11,6)	7 (9,1)	
	Otros países de Europa	59 (8,7)	6 (7,8)	
	África	41 (6,1)	5 (6,5)	
	Asia	3 (0,4)	0 (0,0)	
Categoría de transmisión	UDVP	18 (2,7)	0 (0,0)	0,411
	HSH	476 (70,0)	59 (76,6)	
	HTX	175 (25,7)	17 (22,1)	
	Otro	11 (1,6)	1 (1,3)	
SIDA		136 (20,0)	14 (18,2)	0,704
Diagnóstico tardío		335 (49,3)	37 (48,1)	0,840
Seroconvertores recientes*		165 (24,3)	28 (36,4)	0,021
Tiempo de seroconversión (meses)		15,1 (7,5-27,7)	13,8 (8,6-24,3)	0,379

Las variables cuantitativas se expresan como media o mediana(según sigan o no una distribución normal) e IQR (rango intercuartílico), y las cualitativas como n (%)

*Serología previa negativa en el último año

Resultados

Tabla 16. Características basales de los pacientes que presentaban cepas virales con o sin resistencias primarias a IP

		Resistencias primarias a IP		<i>p</i>
		No N=740	Sí N=17	
Sexo	Hombre	653 (88,2)	15 (88,2)	0,999
	Mujer	87 (11,8)	2 (11,8)	
Edad (años)		43 (34-50)	37 (31-42)	0,473
Linfocitos CD4 (células/μL)		370 (160-524)	479 (347-646)	0,541
CV (log n° copias/mL)		4,8 (4,4-5,4)	4,7 (4,0-5,1)	0,270
Origen	Español	545 (73,7)	12 (70,6)	0,777
	Inmigrante	195 (26,3)	5 (29,4)	
Procedencia	España	545 (73,7)	12 (70,6)	0,539
	Sudamérica	83 (11,2)	3 (17,6)	
	Otros países de Europa	65 (8,8)	0 (0,0)	
	África	44 (5,9)	2 (11,8)	
	Asia	3 (0,4)	0 (0,0)	
Categoría de riesgo	UDVP	18 (2,4)	0 (0,0)	0,403
	HSH	522 (70,5)	13 (76,5)	
	HTX	189 (25,5)	3 (17,6)	
	Otro	11 (1,5)	1 (5,9)	
SIDA		147 (19,8)	3 (17,6)	0,821
Diagnóstico tardío		368 (49,7)	4 (23,5)	0,033
Seroconvertidores recientes*		190 (25,7)	3 (17,6)	0,453
Tiempo de seroconversión (meses)		15,1 (7,8-27,7)	11,8 (1,2-ND)	0,708

Las variables cuantitativas se expresan como media o mediana (según sigan o no una distribución normal) e IQR (rango intercuartílico), y las cualitativas como n (%).

*Seroología previa negativa en el último año

ND: No determinado

5.4. Subtipado

5.4.1. Métodos de subtipado

A partir de las 757 secuencias de los pacientes incluidos en nuestro estudio, se determinó el subtipo del VIH-1, empleándose para ello 4 métodos diferentes: 3 herramientas automáticas (COMET, Geno2pheno y REGA), y un análisis filogenético donde además de nuestras secuencias se incluyeron al menos dos de referencia para los distintos subtipos y CRFs conocidas hasta el momento (Figura 1 del ANEXO).

En la Figura 21 podemos observar la distribución de las variantes del VIH-1 según el método utilizado para la determinación del subtipo viral.

La clasificación del subtipo B varió de forma significativa según el método ($p < 0,001$), siendo similar el porcentaje encontrado en la filogenia (73,8%) y la herramienta REGA (75,6%), por un lado, y COMET (82,6%) y Geno2pheno (83,6%), por otro.

Respecto a las variantes no-B, también encontramos diferencias significativas ($p < 0,003$) dependiendo de la opción de subtipado que se utilice. Esta discrepancia se mantiene tanto en los subtipos no-B puros como en las variantes recombinantes CRF01_AE, CRF02_AG, CRF06_cpx, CRF12_BF, CRF14_BG y CRF24_BG. La Tabla 17 nos muestra la clasificación de los subtipos obtenidos de acuerdo a cada uno de los cuatro métodos de subtipado.

La filogenia se ha considerado como la técnica *gold standard* para la clasificación en subtipos de la cohorte (apartado 5.4.2), sirviendo como referencia para la evaluación de la sensibilidad y especificidad de las tres herramientas de identificación del subtipo de VIH-1 empleadas, cuyos resultados se muestran en la Tabla 18.

Considerando la cohorte completa, donde hay una predominancia del subtipo B (73,8%), la sensibilidad de las tres herramientas automáticas fue superior al 90%, destacando entre ellas la versión 3.4 de Geno2pheno, con una sensibilidad cercana al 100% (99,18%; IC 95: 98,46-99,90). Sin embargo, cuando nos centramos en las variantes no-B, solo REGA 3.0 se acercó a una sensibilidad para identificarlas del 50% (46,46%; IC 95: 39,52-53,41), si bien la especificidad era superior al 90% en todos los casos.

Distribución de las variantes del VIH-1 (n)

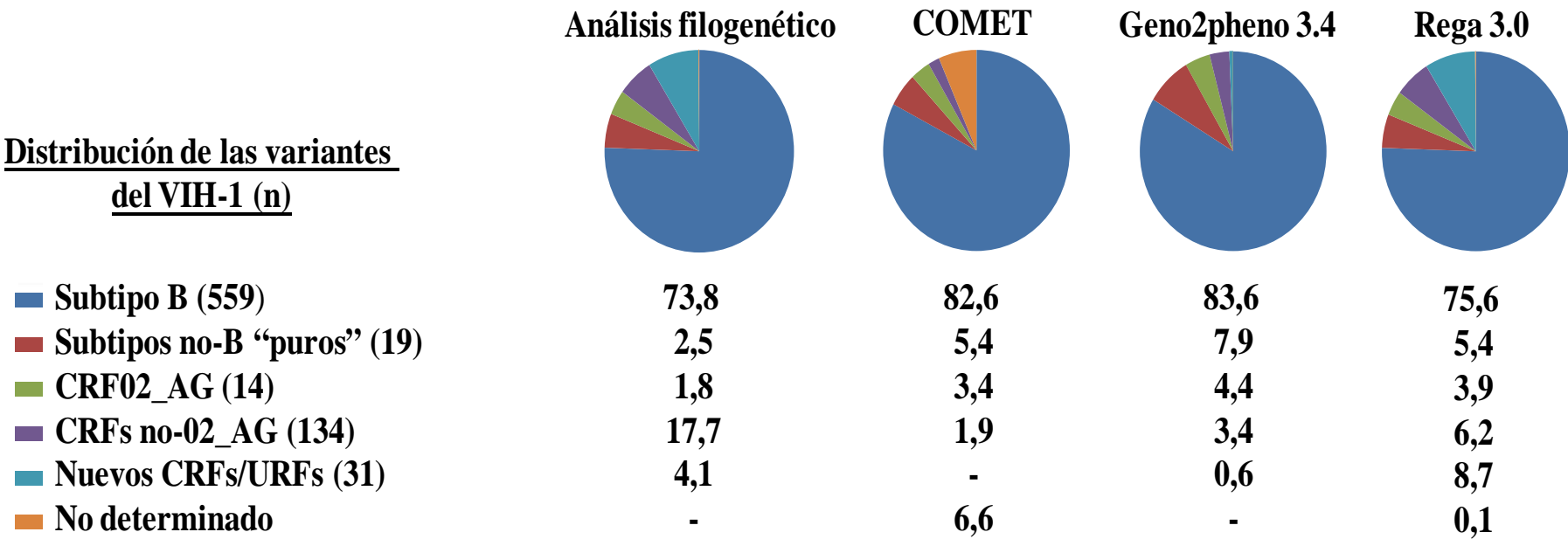


Figura 21. Distribución de las variantes del VIH-1 (%) en la cohorte según cada método de subtipificación; (n), número de secuencias de acuerdo al análisis filogenético; CRF, formas recombinantes circulantes; URF, formas recombinantes únicas

Resultados

Tabla 17. Comparación de los subtipos obtenidos mediante el uso de 3 herramientas de subtipado automáticas vs. análisis filogenético para las 757 secuencias (PR+RT) del VIH-1 incluidas en el estudio

Subtipos VIH-1	COMET	Geno2pheno 3,4	REGA 3.0	Análisis filogenético	<i>p</i>
B	625 (82,6)	633 (83,6)	572 (75,6)	559 (73,8)	<0,001
no-B:	132 (17,4)	124 (16,4)	185 (24,4)	198 (26,2)	0,003
A1	9 (1,2)	4 (0,5)	8 (1,1)	5 (0,7)	0,01
C	13 (1,7)	16 (2,1)	10 (1,3)	6 (0,8)	0,01
D	1 (0,1)	17 (2,2)	-	-	0,3
F1	7 (0,9)	10 (1,3)	7 (0,9)	3 (0,4)	0,01
F2	2 (0,3)	2 (0,3)	2 (0,3)	2 (0,3)	0,02
G	9 (1,2)	11 (1,5)	14 (1,8)	3 (0,4)	0,02
CRF01_AE	6 (0,8)	14 (1,8)	11 (1,5)	9 (1,2)	0,009
CRF02_AG	26 (3,4)	33 (4,4)	30 (3,9)	14 (1,8)	0,008
CRF03_AB	-	1 (0,1)	-	-	0,3
CRF06_cpx	1 (0,1)	4 (0,5)	3 (0,4)	2 (0,3)	0,03
CRF07_BC	-	1 (0,1)	-	-	0,3
CRF09_cpx	-	1 (0,1)	-	1 (0,1)	0,1
CRF12_BF	5 (0,7)	3 (0,4)	6 (0,8)	6 (0,8)	0,005
CRF14_BG	-	2 (0,3)	2 (0,3)	3 (0,4)	0,06
CRF19_cpx	-	-	21 (2,8)	21 (2,8)	0,1
CRF24_BG	1 (0,1)	-	1 (0,1)	1 (0,1)	0,05
CRF29_BF	1 (0,1)	-	2 (0,3)	3 (0,4)	0,1
CRF30_0206	-	-	-	14 (1,8)	0,3
CRF31_BC	-	-	-	3 (0,4)	0,3
CRF32_06A1	-	-	-	1 (0,1)	0,3
CRF36_cpx	-	-	-	1 (0,1)	0,3
CRF38_BF	-	-	-	3 (0,4)	0,3
CRF42_BF	-	-	-	10 (1,3)	0,3
CRF43_02G	-	-	-	4 (0,5)	0,3
CRF44_BF	-	-	-	1 (0,1)	0,3
CRF47_BF	1 (0,1)	-	1 (0,1)	1 (0,1)	0,05
CRF50_A1D	-	-	-	1 (0,1)	0,3
CRF51_01B	-	-	-	44 (5,8)	0,3
CRF63_02A1	-	-	-	1 (0,1)	0,3
CRF71_BF	-	-	-	3 (0,4)	0,3
CRF72_BF	-	-	-	1 (0,1)	0,3
nueva CRF/ URF*	-	5 (0,6)	66 (8,7)	31 (4,1)	0,1
ND	50 (6,6)	-	1 (0,1)	-	0,3

CRF, forma recombinante circulante; URF, forma recombinante única; ND: No determinado.

*Cuando una secuencia no sea asignada por una herramienta automática a ningún subtipo o CRF conocida, pero se determine compuesta por segmentos de subtipos puros, será considerado una nueva CRF/URF

Resultados

Tabla 18. Sensibilidad de las herramientas automáticas de subtipado vs. análisis filogenético para la clasificación de las 757 secuencias de los pacientes VIH-1 incluidos en nuestra cohorte

HIV-1 variants	COMET		Geno2Pheno 3.4		Rega 3.0	
	% Sens (95% CI)	% Spec (95% CI)	% Sens (95% CI)	% Spec (95% CI)	% Sens (95% CI)	% Spec (95% CI)
B	99.64 (99.15-100.00)	65.66 (59.04 -72.27)	99.82 (99.47-100.00)	62.12 (55.36-68.88)	91.59 (89.29-93.89)	69.70 (63.30-76.10)
no-B (todos los subtipos excepto el B)	21.21 (15.52-26.91)	83.90 (80.85-86.95)	22.73 (16.89-28.56)	85.87 (82.98-88.76)	46.46 (39.52-53.41)	83.36 (80.28-86.45)
A1	80.00 (44.94-100.00)	99.34 (98.75-99.92)	40.00 (-2.94-82.94)	99.73 (99.37-100.00)	80.00 (44.94-100.00)	99.47 (98.95-99.99)
C	100.00 (100.00-100.00)	99.07 (98.38-99.76)	100.00 (100.00-100.00)	98.67 (97.85-99.49)	100.00 (100.00-100.00)	99.47 (98.95-99.99)
D	-	0.00 (0.00-0.00)	-	0.00 (0.00-0.00)	-	100.00 (100.00-100.00)
F1	100.00 (100.00-100.00)	99.47 (98.95-99.99)	100.00 (100.00-100.00)	99.07 (98.39-99.76)	100.00 (100.00-100.00)	99.47 (98.95-99.99)
F2	100.00 (100.00-100.00)	100.00 (100.00-100.00)	100.00 (100.00-100.00)	100.00 (100.00-100.00)	100.00 (100.00-100.00)	100.00 (100.00-100.00)
G	100.00 (100.00-100.00)	99.20 (98.57-99.84)	100.00 (100.00-100.00)	98.94 (98.21-99.67)	100.00 (100.00-100.00)	98.54 (97.69-99.40)
CRF01_AE	66.67 (35.87-97.47)	100.00 (100.00-100.00)	100.00 (100.00-100.00)	99.33 (98.75-99.92)	100.00 (100.00-100.00)	99.73 (99.36-100.00)
CRF02_AG	78.57 (57.08-100.00)	97.98 (96.97-98.99)	92.86 (79.37-100.00)	97.31 (96.14-98.47)	92.86 (79.37-100.00)	97.71 (96.64-98.79)
CRF19_cpx	0.00 (0.00-0.00)	-	0.00 (0.00-0.00)	-	100.00 (100.00-100.00)	100.00 (100.00-100.00)
CRF30_0206	0.00 (0.00-0.00)	-	0.00 (0.00-0.00)	-	0.00 (0.00-0.00)	-
CRF42_BF	0.00 (0.00-0.00)	-	0.00 (0.00-0.00)	-	0.00 (0.00-0.00)	-
CRF51_01B	0.00 (0.00-0.00)	-	0.00 (0.00-0.00)	-	0.00 (0.00-0.00)	-
nuevo CRF/URF*	0.00 (0.00-0.00)	93.11 (91.27-94.96)	0.00 (0.00-0.00)	99.31 (98.71-99.91)	48.57 (32.01-65.13)	93.07 (91.22-94.93)
Total	92.30 (90.24-94.35)	71.30 (62.76-79.83)	99.18 (98.46-99.90)	79.19 (72.68-85.71)	90.74 (88.53-92.96)	81.63 (73.97-89.30)

Sens: sensibilidad; Spec: Especificidad; IC, intervalo de confianza; CRF, forma recombinantes circulante; URF, forma recombinante única.

*Cuando una secuencia no sea asignada por una herramienta automática a ningún subtipo o CRF conocida, pero se determine compuesta de segmentos de subtipos puros, será considerado un nuevo CRF/URF

Resultados

Al discriminar entre subtipos no-B puros y las formas recombinantes más prevalentes en la cohorte, las principales diferencias de sensibilidad entre las tres herramientas se encuentran para identificar estas últimas, con la salvedad del subtipo A1, para el cual Geno2pheno mostró una sensibilidad del 40% (IC 95: -2.94-82.94), muy baja en relación a la presentada por los otros métodos rápidos.

La sensibilidad para detectar la CRF01_AE fue del 100% con Geno2pheno y REGA, e igualmente alta (superior al 90%) para la CRF02_AG con estas dos herramientas.

COMET mostraba una sensibilidad menor, del 66,67% (IC 95:35,87-97,47) para CRF01_AE y ligeramente mayor, pero igualmente más baja que las otras dos herramientas, para CRF02_AG (78,57%; IC 95: 57,08-100,00).

La especificidad para estos dos recombinantes fue muy elevada (superior al 97%), especialmente para la CRF01_AE, donde osciló entre el 99% y el 100% con las tres herramientas.

Sólo la versión 3.0 de REGA fue capaz de detectar la variante CRF19_cpx, con una especificidad también del 100%. Esta forma recombinante era asignada en 17 de los casos erróneamente por Geno2pheno al subtipo D.

Cuando una secuencia no era asignada por una herramienta automática a ningún subtipo o ninguna CRF conocida, pero el resultado mostraba que estaba compuesta de segmentos de subtipos puros, la consideramos para nuestros cálculos de sensibilidad y especificidad como una nueva CRF o una URF. Así, ni COMET ni Geno2pheno eran capaces de detectar ninguno de los que posteriormente, por filogenia y análisis mediante Simplot, se vio que podría tratarse de URFs o nuevos recombinantes no descritos. Sin embargo, la versión 3.0 de REGA sí que era capaz de identificar casi el 50% de ellos (48,57%; IC: 32,01-65,13), con una especificidad superior al 90%.

5.4.2. Análisis de los subtipos

Nos basamos, por un lado, en el análisis filogenético (Figura 1 del ANEXO) y, por otro, en el estudio pormenorizado de eventos de recombinación mediante el programa Simplot, para aquellas secuencias no agrupadas con ninguna de referencia según los criterios seleccionados (*clusters* con valores de *bootstrap* mayores al 70%). Así, de nuestras 757

Resultados

secuencias, 559 pertenecían al **subtipo B** (73,8%), mientras que 198 presentaban una variante no-B (26,2%).

Dentro de estas últimas, solamente 19 (9,6%) eran subtipos no-B puros: 5 (0,7%) **A1**, 6 (0,8%) **C**, 3 (0,4%) **F1**, 2 (0,3%) **F2**, y 3 (0,4%) **G**. Las 179 secuencias remanentes, que representaban el 90,4% de los subtipos no-B, eran recombinantes (Tabla 17). Ciento cuarenta y ocho (82,6% de estos recombinantes) se agrupaban dentro de 23 CRFs diferentes, siendo las de mayor prevalencia la **CRF51_01B** (5,8%) con 44 secuencias, la **CRF19_cpx** (2,8%) con 21, y en tercer lugar, con 14 secuencias cada una, las **CRF02_AG** y **CRF30_0206** (1,8%). Las **CRF01_AE** y **CRF42_BF**, con 9 (1,2%) y 10 (1,3%) secuencias, respectivamente, también destacarían dentro de las formas recombinantes en cuanto a representación en nuestra cohorte.

Finalmente, 31 secuencias (17,3% de los recombinantes) no se agrupaban con ningún subtipo ni ninguna CRF conocidas, presentando patrones complejos en mosaico, los cuales incluían fragmentos de 6 subtipos puros diferentes (A1, B, C, D, F1 y G). En concreto, encontramos seis secuencias recombinantes (19,3%) con fragmentos de los subtipos B/D, e igual número con B/C; cinco A1/G (16,1%); cuatro B/G (12,9%); y una B/F1 (3,2%). Las restantes secuencias recombinantes respondían a combinaciones más complejas, de tres subtipos puros como mínimo: A1/B/F1, BDGF1 y A/B/D (cada una con dos secuencias, 6,4%); A1/B/G y B/D/F1 (con un solo representante cada una, 3,2%). Cabe señalar que estas 31 secuencias recombinantes procedían de pacientes diagnosticados a lo largo de todo el periodo del estudio, destacando el año 2009 con nueve secuencias no adscritas a ningún subtipo puro o ninguna CRF conocidas.

En la Figura 22 podemos observar la evolución de los subtipos no-B, mostrando el porcentaje que hubo de estos en cada año del estudio, destacando 2012, 2013 y 2014 como los que tuvieron un mayor porcentaje de variantes no-B en la población.

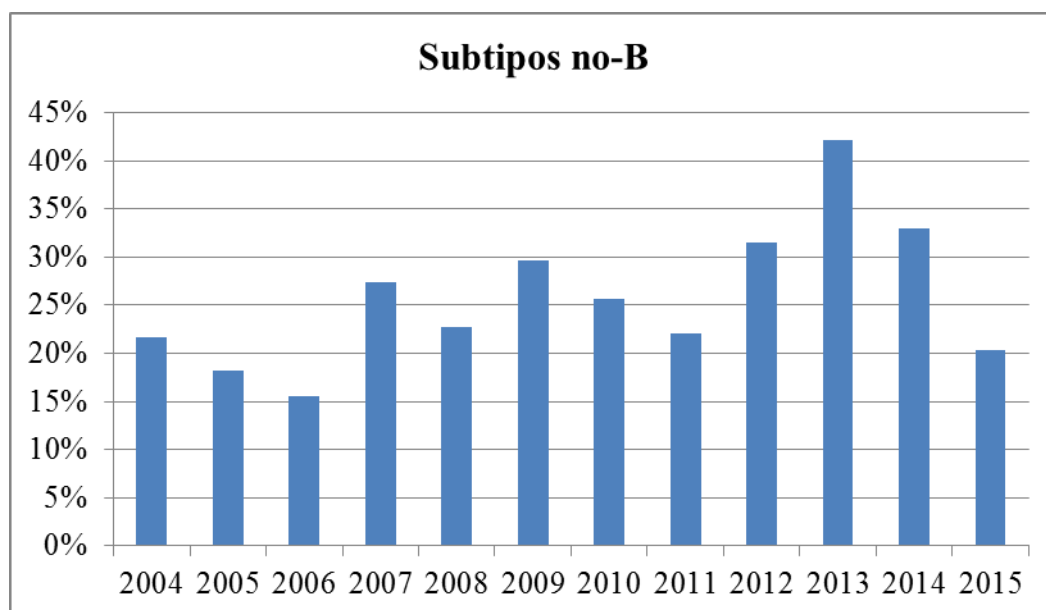


Figura 22. Evolución de los subtipos no-B durante los años de estudio

En la Tabla 19 se comparan las diferentes características de los pacientes que presentaban cepas virales con subtipo B vs. subtipos no-B. Los subtipos no-B fueron más frecuentes en el segundo periodo y dentro de ellos hubo una mayor proporción de mujeres, origen no español y mayor frecuencia de transmisión HTX. En la Tabla 20 observamos de forma más detallada, las diferencias que hubo en los subtipos no-B según la nacionalidad y el periodo de estudio considerado.

Resultados

Tabla 19. Características clínico-epidemiológicas de los pacientes que presentaban cepas virales con subtipo B y no-B

		Subtipos VIH-1		<i>p</i>
		Subtipo B N=559	Subtipos no-B N=198	
Sexo	Hombre	508 (90,9)	160 (80,8)	<0,001
	Mujer	51 (8,1)	38 (19,2)	
Edad (años)		42 (34-50)	40 (33-49)	0,473
Linfocitos CD4 (células/μL)		361 (175-539)	311 (123-460)	0,399
CV (log n° copias/mL)		4,9 (4,3-5,3)	5,0 (4,3-5,3)	0,399
Origen	Español	440 (78,7)	117 (59,1)	<0,001
	Inmigrante	119 (21,3)	81 (40,9)	
Procedencia	España	440 (78,7)	117 (59,1)	<0,001
	Sudamérica	58 (10,4)	28 (14,1)	
	Otros países de Europa	47 (8,4)	18 (9,1)	
	África	13 (2,3)	33 (16,7)	
	Asia	1 (0,2)	2 (1,0)	
Categoría de transmisión	UDVP	13 (2,3)	5 (2,5)	<0,001
	HSH	418 (74,8)	117 (59,1)	
	HTX	118 (21,1)	74 (37,4)	
	Otro	10 (1,8)	2 (1,0)	
Periodo	A	264 (47,2)	77 (38,9)	0,043
	B	295 (52,8)	121 (61,1)	
Mutaciones de resistencia		53 (9,5)	65 (32,8)	<0,001
SIDA		103 (18,4)	47 (23,7)	0,107
Diagnóstico tardío		265 (47,4)	107 (54,0)	0,109
Seroconvertores recientes*		147 (26,3)	46 (23,2)	0,395
Tiempo de seroconversión (meses)		13,4 (7,3-24,7)	21,9 (10,9-36,0)	0,375

Las variables cuantitativas se expresan como media o mediana (según sigan o no una distribución normal) e IQR (rango intercuartílico) y las cualitativas como n (%)

*Serología previa negativa en el último año

Resultados

Tabla 20. Prevalencia de subtipos no-B según nacionalidad y periodo de estudio

	Subtipos no-B	Periodo A	Periodo B	<i>p</i>
	N= 198	N=77	N=121	
	n (%)	n (%)	n (%)	
Españoles	117 (59,1)	34 (44,1)	83 (68,6)	
Africanos	28 (14,1)	24 (31,2)	9 (7,4)	
Sudamericanos	18 (9,1)	10 (13,0)	18 (14,9)	<0,001
Resto de europeos	33 (16,7)	9 (11,7)	9 (7,4)	
Asiáticos	2 (1,0)	0 (0,0)	2 (1,6)	

De los 31 pacientes mencionados cuya cepa infectiva era de un subtipo sin correspondencia a ninguno conocido, 11 de los casos (35,4%) eran HSH y 16 pacientes (51,6%) se habían infectado por contactos heterosexuales, entre ellos 12 mujeres (38,7%). El 61,2% de estas secuencias pertenecían a pacientes de origen español.

En la Tabla 21 se observa la resistencia por familias en los pacientes que presentaban cepas virales con subtipo B y no-B, y la multiresistencia en la Tabla 22.

Tabla 21. Prevalencia de resistencias por familias de antirretrovirales en los pacientes que presentaban cepas virales con subtipo B y no-B

Familia de fármacos	Subtipo B N=559 n (%)	Subtipo no-B N=198 n (%)	<i>p</i>
ITIAN	28 (5,0)	10 (5,0)	0,982
ITINN	21 (3,8)	56 (28,3)	<0,001
IP	9 (1,6)	8 (4,0)	0,047

ITIAN: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos; ITINN: inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos; IP: inhibidores de la proteasa.

Resultados

Tabla 22. Prevalencia de multirresistencia en los pacientes que presentaban cepas virales con subtipo B y no B

Resistencia	Subtipo B	Subtipo no B	<i>p</i>
	N=559 n (%)	N=198 n (%)	
Una familia	49 (8,8)	58 (29,3)	<0,001
Dos familias	3 (0,5)	5 (2,5)	0,019
Tres familias	1 (0,2)	2 (1,0)	0,110

5.5. Dinámica de transmisión del VIH-1

5.5.1. Análisis filoepidemiológico de las cadenas de transmisión

Al realizar el análisis filogenético utilizando las secuencias obtenidas en el estudio de resistencia de los 757 pacientes, 451 (59,6%) se agruparon en 53 cadenas de transmisión (CTs) o *clusters* diferentes, tomando como criterio de inclusión en una CT un valor de *bootstrap* $\geq 90\%$ (Figura 2 del ANEXO).

En la Tabla 23 podemos ver las CTs en relación al número de individuos que las componen, destacando que 28 estaban compuestas por pares y que el mayor número de pacientes asociados a una CT fue de 90.

Las características basales de los pacientes asociados o no a una CT se resumen en la Tabla 24, observándose diferencias en todas las variables, con excepción de la carga viral y del tiempo de seroconversión, que fueron similares para ambos grupos. De forma general, las CT estaban formadas fundamentalmente por pacientes HSH, de origen español y seroconvertidores recientes. Se observó un menor porcentaje de diagnóstico tardío y un menor número de eventos SIDA en aquellos pacientes que se encontraban asociados a alguna CT. Asimismo, las cepas del VIH-1 en *clusters* pertenecían con mayor frecuencia a subtipos no-B y tenían mayor prevalencia de mutaciones de resistencia primarias.

Resultados

Tabla 23. Frecuencia de CTs según el número de individuos que las componen

Nº de <i>clusters</i>	Nº de individuos asociados al <i>cluster</i>
28	2
5	3
3	7
3	5
3	4
1	6
1	8
1	9
1	14
1	17
1	21
1	22
1	29
1	39
1	77
1	90

Resultados

Tabla 24. Características basales de los pacientes asociados a CT vs. fuera de CT

		Total	En <i>cluster</i>	Fuera de <i>cluster</i>	<i>p</i>
Pacientes		757 (100)	451 (59,6)	306 (40,4)	<0,001
Sexo	Hombre	668 (88,2)	415 (92)	253 (82,7)	<0,001
	Mujer	89 (11,2)	36 (8)	53 (17,3)	
Periodo de estudio	A (2004-2009)	341 (45)	175 (38,8)	166 (54,2)	<0,001
	B (2010-2015)	416 (55)	276 (61,2)	140 (45,8)	
Edad (años)		42 (34-50)	41 (32-48)	45 (36-52)	<0,001
Linfocitos CD4 (células/μL)		353 (161-530)	398 (202-505)	334 (109-488)	0,001
CV (log n° copias/mL)		4,8 (4,4-5,4)	4,8 (4,3-5,3)	4,8 (4,3-5,4)	0,548
Origen	Español	557 (73,6)	348 (77,2)	209 (68,3)	0,007
	Inmigrante	200 (26,4)	103 (22,8)	97 (31,7)	
Procedencia	España	557 (73,6)	348 (77,2)	209 (68,3)	0,002
	Sudamérica	86 (11,4)	47 (10,4)	39 (12,7)	
	Otros países de Europa	65 (8,6)	37 (8,2)	28 (9,1)	
	África	46 (6,1)	16 (3,5)	30 (9,8)	
	Asia	3 (0,4)	3 (0,7)	0 (0)	
Categoría de transmisión	HSH	535 (70,7)	357 (79,1)	178 (58,2)	<0,001
	HTX	192 (25,4)	84 (18,6)	108 (35,3)	
	UDVP	18 (2,4)	4 (0,9)	14 (4,6)	
	Otros	12 (1,6)	6 (1,4)	6 (2)	
SIDA		150 (19,8)	72 (16)	78 (25,5)	0,001
Mutaciones de resistencia		118 (15,6)	94 (20,8)	24 (7,8)	<0,001
Diagnóstico tardío		372 (49,1)	199 (44,1)	173 (56,5)	0,001
Subtipos	B	559 (73,8)	305 (67,6)	254 (83,0)	<0,001
	No B	198 (26,2)	146 (32,4)	52 (17,0)	
Seroconvertidores recientes*		193 (25,5)	136 (30,1)	57 (18,6)	<0,001
Tiempo de seroconversión (meses)		14,8 (7,8-27,5)	14,9 (8,5-29,7)	13,8 (7,4-23,7)	0,212

Las variables cuantitativas se expresan como media o mediana (según sigan o no una distribución normal) e IQR (rango intercuartílico), y las cualitativas como n (%)

*Serología previa negativa en el último año

Resultados

El porcentaje de sujetos asociados a las CTs fue mayor en el subtipo no-B que en el B (73,7% vs. 54,5%, $p < 0,001$). Ciertos subtipos se presentaban en nuestra cohorte siempre en una única CT, es decir, fuera de la CT correspondiente no encontrábamos ese subtipo en concreto: subtipo CRF19_cpx (21/21), CRF01_AE (9/9), C (6/6); CRF14_BG (3/3); G (3/3); CRF31_BC (3/3); CRF29_BF (3/3); CRF71_BF (3/3); F2 (2/2) y CRF06_cpx (2/2).

De los 184 pacientes que portaban cepas con mutaciones de resistencia, 136 (73,9%) se encontraban asociados a alguna CT. Si analizamos las mutaciones para cada familia de antirretrovirales en función de las CTs (Tablas 25, 26 y 27), en el caso de los ITIAN las mutaciones que aparecían con mayor frecuencia en *clusters* fueron T69D/N, L210W y K219E/Q, para los ITINN las mutaciones K103N y G190A/S, y para los IP las mutaciones I54L/M y L90M.

Tabla 25. Mutaciones de resistencia a ITIAN en pacientes asociados o no a CT

Mutación	En <i>cluster</i>	Fuera de <i>cluster</i>	<i>p</i>
	(N= 136) n (%)	(N= 48) n (%)	
M41L	3 (2,2)	5 (10,4)	0,201
K65R	0 (0,0)	1 (2,1)	0,224
D67N	22 (16,2)	10 (20,1)	0,280
T69D/N	46 (33,8)	9 (18,7)	<0,001
K70E	0 (0,0)	1 (2,1)	0,224
K70R	0 (0,0)	2 (4,2)	0,086
L74V	1 (0,7)	0 (0,0)	0,410
M184I/V	2 (1,5)	4 (8,4)	0,188
L210W	0 (0,0)	3 (6,2)	0,035
T215D/I/S/V	21 (15,4)	8 (16,7)	0,155
T215F	0 (0,0)	2 (4,2)	0,086
T215Y	0 (0,0)	1 (2,1)	0,224
K219E/Q	26 (19,1)	7 (14,6)	0,021

ITIAN: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos

Resultados

Tabla 26. Mutaciones de resistencia a ITINN en pacientes asociados o no a CT

Mutación	En cluster	Fuera de cluster	<i>p</i>
	(N= 136) n (%)	(N= 48) n (%)	
L100I	0 (0,0)	1 (2,1)	0,224
K101E	2 (1,5)	1 (2,1)	0,802
K103N	29 (21,3)	5 (10,4)	0,002
V106A	10 (7,3)	6 (12,5)	0,810
V179D/E	32 (23,5)	13 (27,1)	0,104
Y181I/C	4 (2,9)	1 (2,1)	0,350
Y188L	0 (0,0)	1 (2,1)	0,224
G190A/S	19 (13,9)	3 (6,2)	0,009
P225H	2 (1,5)	2 (4,2)	0,696

ITINN: inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos

Tabla 27. Mutaciones de resistencia a IP en pacientes asociados o no a CT

Mutación	En cluster	Fuera de cluster	<i>p</i>
	(N= 136) n (%)	(N= 48) n (%)	
L24I	1 (0,7)	0 (0)	0,410
V32I	0 (0,0)	1 (2,1)	0,224
M46I/L	11 (8,1)	4 (8,3)	0,273
I47A/V	0 (0,0)	1 (2,1)	0,224
I50V	0 (0,0)	1 (2,1)	0,224
F53L	2 (1,5)	2 (4,2)	0,696
I54L/M	0 (0,0)	3 (6,2)	0,035
V82L	0 (0,0)	1 (2,1)	0,224
L90M	0 (0,0)	4 (8,3)	0,015

IP: inhibidores de la proteasa

Resultados

En cuanto a los 118 pacientes que portaban cepas virales con resistencia a las diferentes familias de antirretrovirales, 94 (79,7%) se asociaron a alguna CT. La prevalencia de resistencia a ITINN fue la que se observó con una mayor frecuencia en *cluster*, como se detalla en la Tabla 28 y en la Figura 23.

Tabla 28. Prevalencia de resistencia a fármacos antirretrovirales

	Total N= 757 n (%)	En <i>cluster</i> N=451 n (%)	Fuera de <i>cluster</i> N=306 n (%)	p
ITIAN	38 (5,0)	24 (5,3)	14 (4,6)	0,644
ITINN	77 (10,1)	62 (13,7)	15 (4,9)	<0,001
IP	17 (2,2)	12 (2,7)	5 (1,6)	0,349

ITIAN: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos;
ITINN: inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos;
IP: inhibidores de la proteasa.

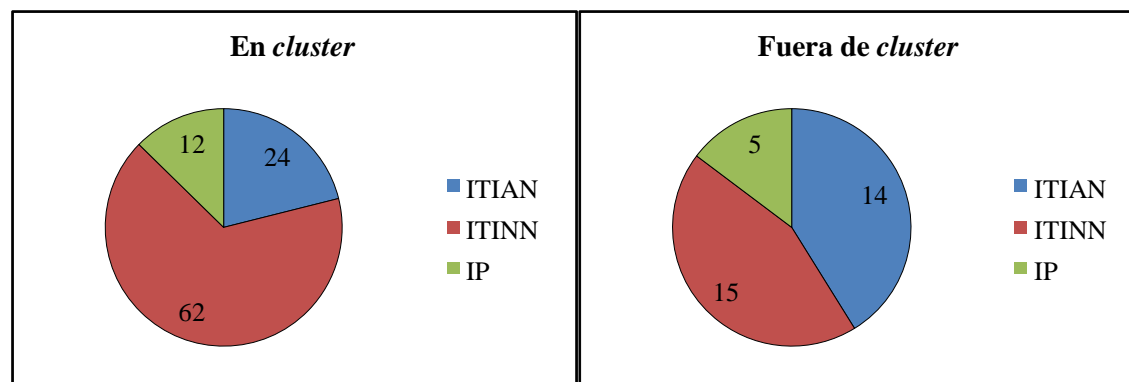


Figura 23. Prevalencia de resistencias para cada familia de antirretrovirales en función de los pacientes asociados o no a una CT

5.5.2. Importancia de las cadenas de transmisión en la propagación de resistencias

El análisis global de las CTs mostró que 368 (48,6%) de los 757 pacientes de nuestro estudio se agruparon en 17 CTs de cinco o más sujetos (Figura 2 del ANEXO). A continuación y siguiendo el orden en el que aparecen numeradas en el árbol filogenético, pasamos a describirlas.

Resultados

CT3:

La CT3, con un valor de *bootstrap* del 100%, está compuesta por 21 pacientes que presentaban cepas virales pertenecientes al subtipo CRF19_cpx. Todos eran HSH, con una mediana de edad de 32 años (26-36) y españoles, a excepción de dos pacientes argentinos. Se diagnosticaron entre 2012-2015, siendo 2014 con 9 pacientes, el año con un mayor número de casos. La mediana de linfocitos CD4 fue de 402 células/ μ L (274-549) y la de carga viral 4,8 log (4,3-5,3). El 61,9% de los pacientes era seroconvertor, con una mediana de tiempo de seroconversión de 15 meses (9,8-28,9). El 47,6% presentaba un diagnóstico tardío y hubo un caso de SIDA al diagnóstico. 16 pacientes estaban infectados por cepas virales con la mutación G190A, de los cuales 11 se agruparon en 3 *subclusters* (Figura 24): A y C, con dos individuos cada una, y B, con siete individuos.

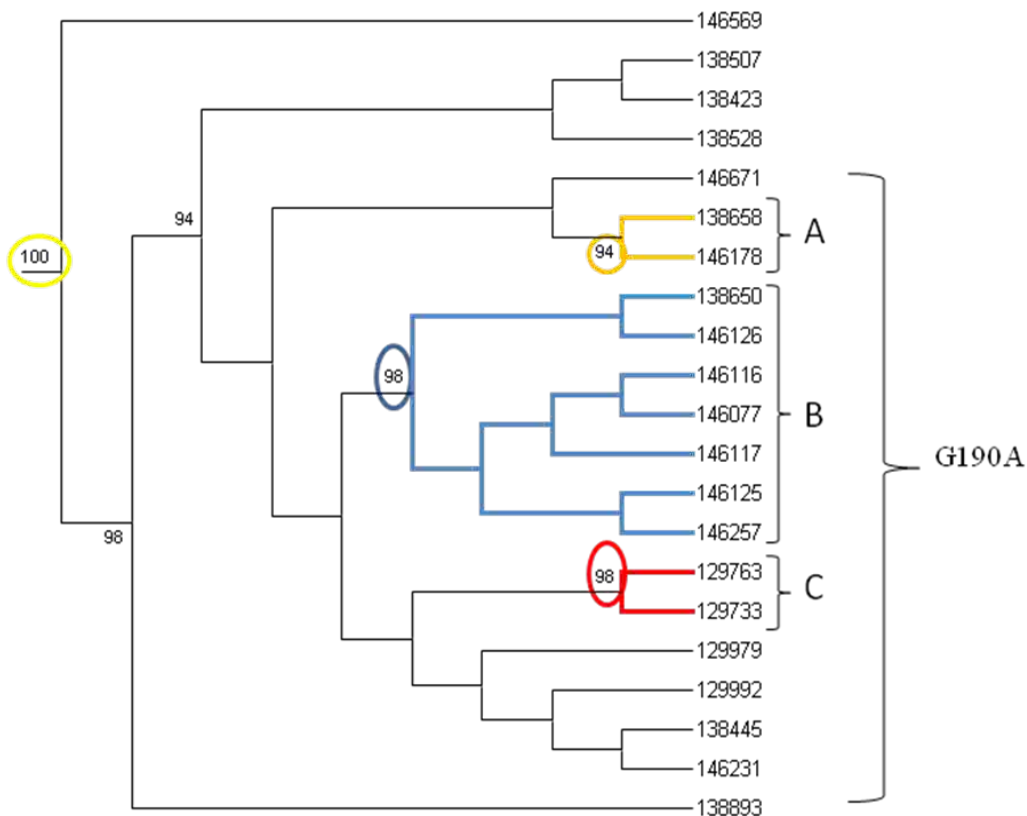


Figura 24. Representación detallada de la topología del árbol filogenético correspondiente al CT3

CT4:

La CT4, con un valor de *bootstrap* del 98%, está compuesta por 39 pacientes que portaban cepas virales pertenecientes al subtipo CRF51_01B. Todos eran HSH, con una mediana de edad de 39 años (32-42) y españoles, a excepción de dos pacientes, uno venezolano y otro danés. Se diagnosticaron entre 2006-2015. Los años en los que hubo un mayor número de casos fueron 2007 con 7, y 2012 y 2013, con 8 diagnósticos cada uno. La mediana de linfocitos CD4 fue de 384 células/ μ L (198-493) y la de carga viral 4,9 log (4,4-5,4). El 30,8% de los pacientes era seroconvertor, con una mediana de tiempo de 13,8 meses (6,7-34,5). El 43,6% presentaba un diagnóstico tardío y hubo 3 casos de SIDA (un linfoma no Hodgkin, un sarcoma de Kaposi y una neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, NPJ).

El 61,5% de las muestras (24 pacientes) contenían cepas virales con mutaciones de resistencia. (Tabla 29). Veinte pacientes portaban cepas virales con la mutación K103N, presentando uno de ellos además el virus con la mutación T69D/N y otro la V179D/E. Dentro de la CT4 se observa la presencia de varios *subclusters* con valores de *bootstrap* por encima del 90% (Figura 25). Entre ellos, destacamos la presencia de un *subcluster* con un valor de *bootstrap* del 97% constituido por 4 pacientes, 2 españoles diagnosticados en 2014, y uno venezolano y otro danés diagnosticados ambos en 2013. Todos estaban infectados por cepas virales con la mutación K103N, a excepción del paciente venezolano que portaba una cepa viral con la mutación K103S. Dos pacientes que presentaban una cepa viral con la mutación G190A se agruparon en otro *subcluster* con valor de *bootstrap* del 73%.

Tabla 29. Mutaciones de resistencia de la CT4 (39 casos)

Mutación	n
K103N	20
G190A	2
K103S	1
K101E	1
T69N	1
V179D	1

Resultados

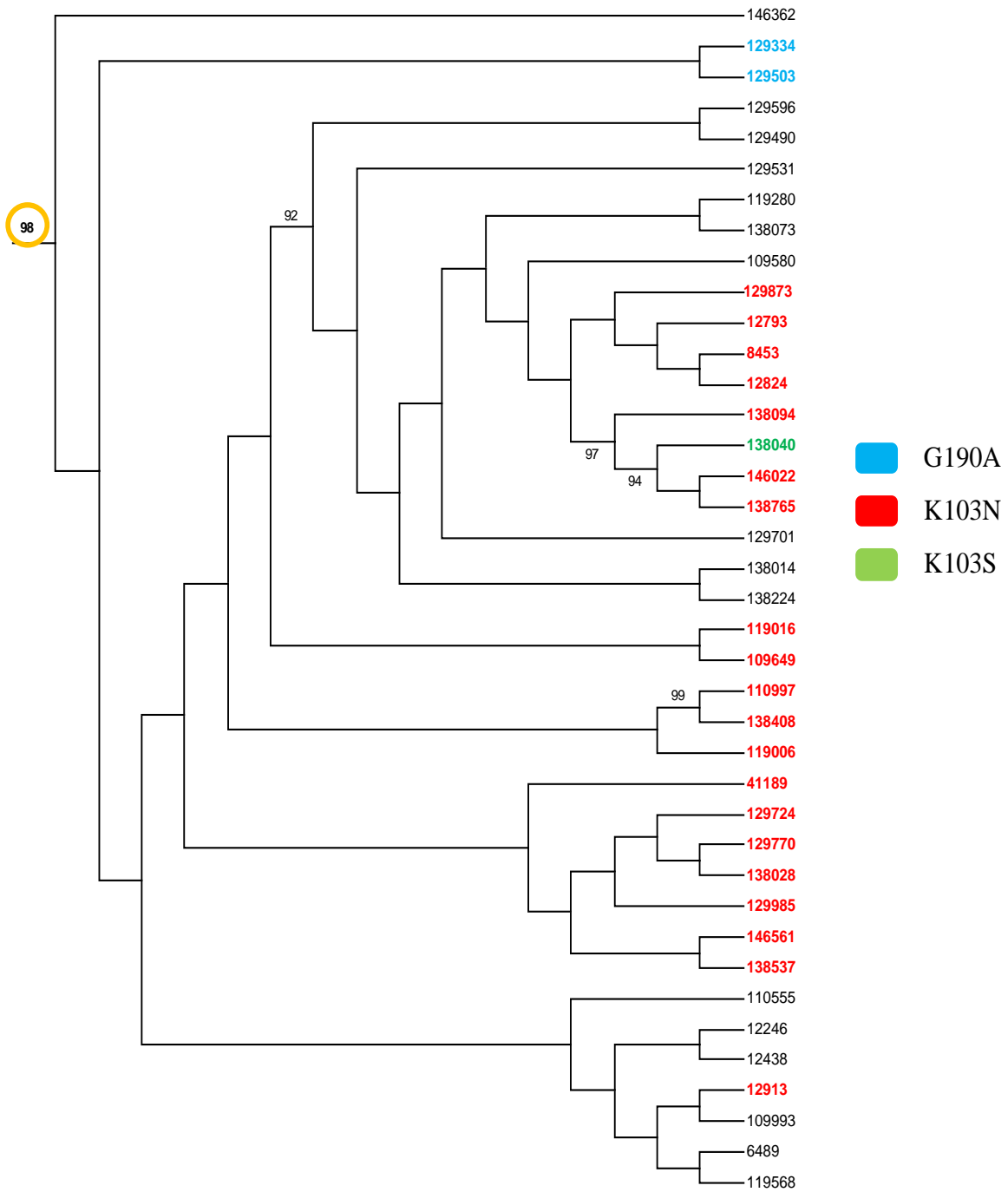


Figura 25. Representación de la topología del árbol filogenético correspondiente a la CT4. En rojo: pacientes que portaban cepas virales con la mutación K103N. En azul: pacientes que portaban cepas virales con la mutación G190A. En verde: paciente que portaba una cepa viral con la mutación K103S

CT10:

La CT10, con un valor de *bootstrap* del 100% está compuesta por 7 pacientes que presentaban cepas virales pertenecientes al subtipo B. Todos eran HSH, con una mediana de edad de 38 años (31-46). Tres eran españoles, dos colombianos, un paraguayo y un cubano. Se diagnosticaron entre 2010 y 2014. La mediana de linfocitos CD4 fue de 444 células/ μ L (219-605) y la de carga viral de 5,0 log (4,6-5,3). Cinco pacientes eran seroconvertidores, con una mediana de tiempo de seroconversión de 12,5 meses (11,5-23,5). Dos pacientes presentaron un evento SIDA (un sarcoma de Kaposi y una candidiasis esofágica). Ningún paciente estaba infectado por cepas virales con mutaciones de resistencia. 6 pacientes se agrupaban en 2 *subclusters*.

CT11:

La CT11, con un valor de *bootstrap* del 92%, está compuesta por 8 pacientes que portaban cepas virales pertenecientes al subtipo B. Siete pacientes eran HSH (en el restante se desconocía el mecanismo de transmisión). La mediana de edad fue de 34 años (27-39). Todos eran españoles, excepto un paciente argentino. Un paciente se diagnosticó en 2006, dos en 2012, tres en 2013 y dos en 2014. La mediana de linfocitos CD4 fue de 490 células/ μ L (239-681) y la de carga viral de 4,3 log (3,6-4,7). Cuatro pacientes eran seroconvertidores, con una mediana de tiempo de seroconversión de 45,3 meses (15,8-49,6). Hubo cuatro diagnósticos tardíos y ningún caso de SIDA. Ningún paciente contenía cepas virales con mutaciones de resistencia. Dentro de la CT11 destacamos la presencia de dos *subclusters*: uno, con un valor de *bootstrap* del 100%, formado por 3 pacientes, 2 españoles y 1 argentino y otro, con un *bootstrap* del 99%, constituido por 5 pacientes, todos españoles.

CT12:

La CT12, con un valor de *bootstrap* del 100%, está compuesta por 7 pacientes que estaban infectados por cepas virales pertenecientes al subtipo B, seis varones (4 HSH y 2 HTX) y una mujer. La mediana de edad fue de 30 años (20-37). Cuatro pacientes eran españoles y los restantes, uno ucraniano, otro rumano y el tercero venezolano. Cinco casos fueron diagnosticados en 2015, mientras que los otros dos lo hicieron en 2013 y 2014, respectivamente. La mediana de linfocitos CD4 fue de 543 células/ μ L (403-716) y la de carga viral de 4,5 log (4,0-4,7). Seis pacientes eran seroconvertidores con una mediana de tiempo de seroconversión de 34,4 meses (26,4-67,3). Uno presentaba un diagnóstico tardío y no hubo

Resultados

casos de SIDA. Ningún paciente portaba cepas virales con mutaciones de resistencia y no hubo *subclusters*.

CT17:

La CT17, con un valor de *bootstrap* del 98%, está compuesta por 17 pacientes que presentaban cepas virales pertenecientes al subtipo B. Todos eran HSH excepto uno que se desconocía su mecanismo de transmisión. La mediana de edad fue de 41 años (31-54). Todos eran españoles, excepto un paciente venezolano. Todos se diagnosticaron entre 2007 y 2014; en este último año se diagnosticaron 4 casos. La mediana de linfocitos CD4 fue de 367 células/ μ L (117-538) y la de carga viral de 5,0 log (4,4-5,9). El 35,3% era seroconvertor, con una mediana de tiempo de seroconversión de 20,1 meses (13,4-23,4). Siete pacientes presentaron un diagnóstico tardío y hubo 2 casos de SIDA: un sarcoma de Kaposi y un linfoma no Hodgkin. Un paciente, el de origen venezolano, presentó una cepa viral con la mutación K103N. Se detectaron varios *subclusters*.

CT21:

La CT21, con un valor de *bootstrap* del 96%, está compuesta por 29 pacientes que portaban cepas virales pertenecientes al subtipo B. Todos HSH con una mediana de edad de 35 años (30-37). En cuanto a procedencia, 23 eran españoles y el resto venezolanos, colombianos, ecuatorianos, rumanos, rusos y daneses. Fueron diagnosticados entre 2004 y 2015; en 2008 y en 2012 se diagnosticaron 8 casos cada año. La mediana de linfocitos CD4 fue de 390 células/ μ L (163-535) y la de carga viral de 4,9 log (3,3-5,2). El 27,6% de los pacientes era seroconvertor, con una mediana de tiempo de seroconversión de 12,5 meses (10,0-25,4). Casi la mitad (14 casos) presentó diagnóstico tardío y hubo 2 casos de SIDA (un sarcoma de Kaposi y una neumonía por *Pneumocystis jirovecii*). Ninguno de los pacientes presentó cepas virales con mutaciones de resistencia y se detectaron varios *subclusters*.

CT26:

La CT26, con un valor de *bootstrap* del 100%, está compuesta por 5 pacientes que estaban infectados por cepas virales pertenecientes al subtipo B. Todos eran HSH, a excepción de un paciente que refería solamente relaciones HTX. La mediana de edad fue de 49 años (43-55). Cuatro eran españoles y uno chileno. En 2004 se diagnosticaron cuatro y en 2005 uno. La mediana de linfocitos CD4 fue de 318 células/ μ L (49-608) y la de carga viral de

Resultados

5,0 log (4,2-5,7). Ninguno de los pacientes era seroconvertor, tres eran diagnósticos tardíos, hubo dos casos de SIDA (un sarcoma de Kaposi y un linfoma cerebral primario) y ningún paciente portaba cepas virales con mutaciones de resistencia.

CT29:

La CT29, con un valor de *bootstrap* del 90%, está compuesta por 90 pacientes que presentaban cepas virales pertenecientes al subtipo B. Había 86 varones (79 HSH, 5 HTX y 2 cuya vía de transmisión era desconocida) y 4 mujeres, con una mediana de edad de 40 años (32-47). El 80% de los pacientes eran españoles y el resto procedía de diferentes países sudamericanos, europeos y africanos. Se diagnosticaron a lo largo de todo el periodo de estudio (2004-2015), siendo 2011 con 15, 2014 con 14 y 2007 con 12 casos, los años de mayor número de diagnósticos. La mediana de linfocitos CD4 fue de 428 células/ μ L (195-599) y la de carga viral de 4,7 log (4,4-5,2). El 28,9% de los pacientes era seroconvertor, con una mediana de tiempo de seroconversión de 11,8 meses (6,4-21,1). El 40% tenía un diagnóstico tardío y once (11,2%) SIDA al diagnóstico. Quince pacientes presentaron cepas virales con mutaciones de resistencia: 7 con la M46L, 4 la V106A, 2 la K103N y 2 la V179D.

Se observaron varios *subclusters* con valores de *bootstrap* por encima del 90%. Los 4 pacientes que portaban cepas virales con la mutación V106A se agruparon en dos *subclusters* diferentes de 2 individuos cada uno: uno con un valor de *bootstrap* del 100%, formado por dos hombres HSH; y otro con un 95% de valor de *bootstrap* y constituido por un hombre HTX y una mujer. Los 7 pacientes que contenían cepas virales con la mutación M46L se agrupaban en un *subcluster* con valor de *bootstrap* del 89%, 5 de ellos agrupados al 97%. Por su parte, los 2 pacientes que presentaban cepas virales con la mutación V179D quedaron emparejados en un *subcluster* con valor de *bootstrap* del 98%. Por último, otro *subcluster*, con valor de *bootstrap* del 99%, estaba constituido por otro hombre HTX y una mujer.

CT30:

La CT30, con un valor de *bootstrap* del 98%, está compuesta por 9 pacientes que estaban infectados por cepas virales pertenecientes al subtipo B. Siete HSH y dos varones HTX. La mediana de edad fue de 42 años (36-53). Todos eran españoles menos un paciente británico. Cuatro casos fueron diagnosticados en 2015, dos en 2006 y en 2008, y uno en 2004. La mediana de linfocitos CD4 fue de 301 células/ μ L (139-417) y la de carga viral de 4,7 log

Resultados

(4,2-5,3). Solamente hubo un paciente seroconvertor y 5 presentaron un diagnóstico tardío. Hubo un evento SIDA (tuberculosis ganglionar). No se detectaron mutaciones de resistencia.

CT34:

La CT34, con un valor de *bootstrap* del 95%, está compuesta por 14 pacientes que portaban cepas virales pertenecientes al subtipo B. Todos HSH y españoles, con una mediana de edad de 36 años (31-42). Fueron diagnosticados entre 2006 y 2013, siendo 2009 con 5 casos el año con un mayor número de diagnósticos. La mediana de linfocitos CD4 fue de 434 células/ μ L (298-499) y la de carga viral de 4,6 log (4,3-5,1). Cinco eran seroconvertores, con una mediana de tiempo de seroconversión de 12,0 meses (7,0-36,3) y 5 se presentaron como diagnóstico tardío. No hubo ningún caso de SIDA ni mutaciones de resistencia detectadas.

CT36:

La CT36, está compuesta por 77 pacientes que se agrupan con un valor de *bootstrap* del 96%. 55 eran varones (49,4% HTX, 45,5% HSH y 3,9% UDVP) y 22 mujeres. La mediana de edad fue de 43 años (35-51). Fueron diagnosticados entre 2004 y 2015, destacando 2012 y 2014 como los años con mayor número de diagnósticos. En cuanto al origen de los pacientes, 38 eran españoles, mientras que el resto procedían de diferentes países de Sudamérica, Europa y África. Esta CT se caracteriza porque existe una gran diversidad en cuanto al subtipo que presentan las cepas virales que infectan a estos pacientes, la cual podemos observar detalladamente en la Tabla 30.

Resultados

Tabla 30. Subtipos que presentaban las cepas virales de los pacientes agrupados en la CT36 (por orden decreciente de individuos representados)

Subtipo	N=77 n (%)
CRF01_AE	14 (18,2)
Nueva CRF/URF	13 (16,9)
CRF02_AG	11 (14,3)
C	6 (7,8)
CRF12_BF	4 (5,2)
G	3 (3,9)
CRF14_BG	3 (3,9)
CRF29_BF	3 (3,9)
CRF71_BF	3 (3,9)
CRF31_BC	3 (3,9)
CRF30_0206	2 (2,6)
CRF38_BF	2 (2,6)
F1	2 (2,6)
F2	2 (2,6)
CRF32_061	1 (1,3)

La mediana de linfocitos CD4 fue de 319 células/ μ L (54-459) y la de carga viral de 4,9 log (4,3-5,4). El 14,3% era seroconvertor, con una mediana de tiempo de seroconversión de 24,3 meses (12,1-47,6). El 55,8% tenía diagnóstico tardío y un tercio un evento SIDA (24 casos). Doce pacientes presentaron cepas virales con mutaciones de resistencia, destacando la presencia de K103N en 4 pacientes, V106A en otros 4 y M46IL en los 4 restantes. Dos de los pacientes que portaban cepas virales con la mutación K103N, contenían al mismo tiempo otras mutaciones, P225H y M184V en una de ellas, y solamente la P225H en la otra. Por otro lado, en cuanto a la presencia de mutaciones accesorias, 17 pacientes portaban cepas virales con la mutación K20I, observándose en dos de ellas de manera conjunta con la mutación L10I. Ocho pacientes estaban infectados por cepas virales con la mutación V179I, y, por último, 4 pacientes portaban cepas virales con la mutación A62V.

En la Figura 26 se muestran los diferentes *subclusters* detectados:

A: asocia 3 pacientes, 2 hombres españoles HTX y 1 hombre brasileño HSH. Todos presentaban cepas virales pertenecientes al subtipo CRF29_BF. Ninguno estaba infectado por cepas virales con mutaciones de resistencia.

Resultados

B: 2 hombres españoles, 1 HTX y otro HSH, diagnosticados en 2008 y 2009, respectivamente, que portaban cepas virales pertenecientes al subtipo CRF38_BF. Ninguno presentaba cepas virales con mutaciones de resistencia.

C: 2 mujeres, una española y otra paraguaya, ambas estaban infectadas por cepas virales pertenecientes al subtipo CRF12_BF. Los otros dos pacientes que también presentaban cepas virales con el mismo subtipo, se agruparon entre sí en otro *subcluster* independiente a éste, pero con un valor de *bootstrap* <90%.

D: 2 pacientes, un hombre HSH de nacionalidad española y una mujer de origen rumano, ambos portaban cepas virales pertenecientes al subtipo F1. Ninguno estaba infectado por cepas virales con mutaciones de resistencia.

E: 2 pacientes HSH, uno español y otro de nacionalidad brasileña, ambos diagnosticados en 2010 y que presentaban cepas virales pertenecientes al subtipo CRF71_BF. En cuanto a las mutaciones de resistencia, uno portaba una cepa viral con la mutación K103N y el otro una con la V106A. El otro paciente que presentaba una cepa viral perteneciente al subtipo CRF71_BF quedaría agrupado con estos dos pacientes pero con un valor de *bootstrap* menor del 90%.

F: 2 hombres HSH, uno de nacionalidad inglesa y otro brasileña, que estaban infectados por cepas virales pertenecientes al subtipo F2. Ninguno portaba cepas virales con mutaciones de resistencia.

G: 3 hombres HTX, 2 africanos y 1 ruso. Los dos pacientes de origen africano presentaban cepas virales pertenecientes al subtipo CRF06_cpx, mientras que el paciente ruso contenía una cepa viral perteneciente al subtipo CRF32_061. No se detectaron mutaciones de resistencia en ninguno de ellos.

H: 3 pacientes españoles; 2 hombres HSH y una mujer que portaban cepas virales pertenecientes al subtipo CRF14_BG. Ninguno presentaba cepas virales con mutaciones de resistencia.

I: 3 pacientes, 1 hombre español HTX, 1 mujer de nacionalidad lituana, ambos diagnosticados en 2006, y otra mujer de nacionalidad alemana diagnosticada en 2008. Todos portaban cepas virales pertenecientes al subtipo G. Dentro de este *subcluster*, los dos pacientes diagnosticados en 2006 se agrupaban entre sí con un valor de *bootstrap* del 94%.

Resultados

Ambos portaban cepas virales con las mutaciones K103N y P225H, y en uno de ellos la cepa también contenía M184V.

J: 3 pacientes de nacionalidad nigeriana; 2 hombres HTX y una mujer. En cuanto al subtipo, ninguna de las secuencias de los pacientes pudo asociarse filogenéticamente de forma consistente a un subtipo puro o CRF conocida. Tras el análisis con el programa Simplot, se concluyó que se trataba de recombinantes del subtipo B con A y G en distinto porcentaje según el paciente. Ninguno portaba cepas virales con mutaciones de resistencia.

K: asocia un total de 16 pacientes con un valor de *bootstrap* del 91%. En cuanto al subtipo, 11 pacientes presentaban cepas virales pertenecientes a la variante CRF02_AG, mientras que 2 pacientes emparejados con un *bootstrap* del 99% estaban infectados por cepas virales pertenecientes a la forma recombinante CRF30_0206. Los 3 pacientes restantes poseían una secuencia que no se asociaba filogenéticamente de forma consistente a un subtipo puro o CRF conocida, por lo que se analizó cada una de ellas con el programa Simplot. Se obtuvo señal de recombinación para todas ellas, con participación de cepas pertenecientes a más de tres subtipos puros (A1, B, D, F1 y G en distinta combinación). En cuanto a las mutaciones de resistencia todos los pacientes portaban cepas virales con la mutación accesoria K20I.

L: Trece varones y tres mujeres que se agrupan con un valor de *bootstrap* del 99%. En cuanto al subtipo, todos presentaban cepas virales pertenecientes al subtipo CRF01_AE, a excepción de cuatro pacientes que estaban infectados por cepas virales pertenecientes al subtipo A1 y 3 pacientes cuyas secuencias no se asociaron filogenéticamente de forma consistente a un subtipo puro o CRF conocida, y que al analizarse con el programa Simplot, se vio que podría tratarse de una forma recombinante nueva A1G. Siete pacientes portaban cepas virales con mutaciones de resistencia. Dentro de este mismo *subcluster* destacamos la presencia de otros 3: L1, en el cual se agrupan 3 pacientes que presentaban cepas virales con la mutación V106A; L2, constituido por 4 pacientes que portaban cepas virales con la mutación M46IL; y L3, formado por 4 pacientes que contenían cepas virales con la mutación A62V.

M: 8 pacientes españoles, 4 mujeres y 2 hombres HTX, 1 hombre UDVP y otro con conducta de riesgo desconocida. En cuanto al subtipo, ninguna de las secuencias de los pacientes pudo asociarse filogenéticamente de forma consistente a un subtipo puro o CRF

Resultados

conocida. Tras el análisis con Simplot, se vio que se trataba de nuevas formas recombinantes BC, a excepción de dos pacientes emparejados con un *bootstrap* del 94%, cuyas cepas virales eran recombinantes ABD. Ninguno estaba infectado por cepas virales con mutaciones de resistencia.

N: 6 pacientes, de los cuales 3 eran europeos, 2 africanos y 1 de nacionalidad española. 3 hombres HTX, 2 hombres HSH y una mujer, todos portaban cepas virales pertenecientes al subtipo C. Tan solo un paciente estaba infectado por una cepa viral con mutaciones de resistencia, concretamente la mutación K103N.

Ñ: 2 hombres HSH, uno español y otro colombiano, que presentaban cepas virales pertenecientes a la variante CRF31_BC. Ninguno portaba cepas virales con mutaciones de resistencia. El otro paciente que estaba infectado por una cepa viral perteneciente al subtipo CRF31_BC se asociaba también con estos dos pacientes en *cluster* pero con un valor de *bootstrap* menor del 90%.

Resultados

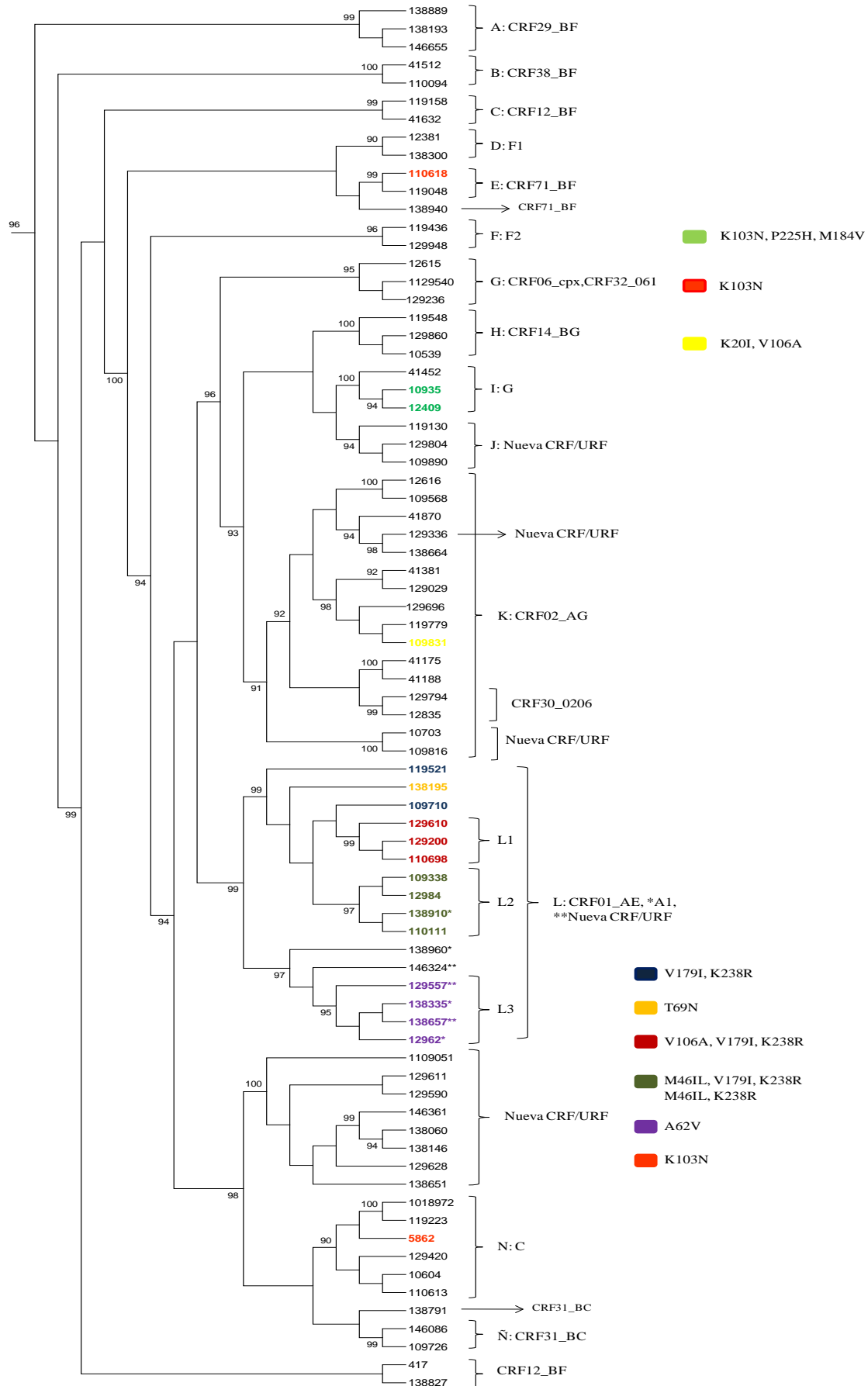


Figura 26. Representación de la topología del árbol filogenético correspondiente al CT n°36. Destacamos con diferentes colores las mutaciones de resistencias detectadas

CT39:

La CT39, con un valor de *bootstrap* del 100%, está compuesta por 6 pacientes que estaban infectados por cepas virales pertenecientes al subtipo B. Todos HSH con una mediana de edad de 38 años (28-48) y españoles. La mediana de linfocitos CD4 fue de 418 células/ μ L (252-597) y la de carga viral de 4,9 log (4,3-5,5). Sólo un paciente era seroconvertor reciente (5,1 meses), dos tenían un diagnóstico tardío y no hubo casos de SIDA ni se detectaron cepas virales con mutaciones de resistencia.

CT43:

La CT43, con un valor de *bootstrap* del 99%, está compuesta por 22 pacientes que presentaban cepas virales pertenecientes al subtipo B. Todos HSH. La mediana de edad fue de 45 años (38-50). 20 eran españoles, uno argentino y otro colombiano. Se diagnosticaron entre el 2007 y el 2015. En 2011 se diagnosticaron 6, 4 en 2012 y 3 en 2014 y 2015. La mediana de linfocitos CD4 fue de 412 células/ μ L (321-566) y la de carga viral de 4,6 log (4,0-5,3). El 31,8% de los pacientes era seroconvertor, con una mediana de tiempo de seroconversión de 20,8 meses (11,3-22,6). Hubo 10 casos de diagnóstico tardío y 6 eventos SIDA: un linfoma no Hodgkin, dos sarcomas de Kaposi y 3 NPJ. Diecisiete pacientes portaban una cepa viral con el mismo patrón de resistencias en la RT (D67N, T69N/D, V118I, V179D, T215S y K219Q). Dicha cepa ya se describió como brote junto a 13 pacientes más procedentes de otros hospitales de la provincia de Málaga⁹⁷. En cuanto a la presencia de *subclusters*, dentro de la CT43 destacamos principalmente uno, con un valor de *bootstrap* del 94%, en el cual se agrupan los 17 pacientes mencionados anteriormente, quedando perfectamente definida la característica de brote de dicha cepa de VIH-1. Por otro lado, 4 pacientes se agrupan en un *subcluster* con un valor de *bootstrap* del 98% presentando todas cepas virales con las mutaciones de resistencia K219Q y V179 D/E. Hubo otro paciente que contenía una cepa viral con la mutación V179D/E, pero dentro de la CT no se asoció a ninguno de los dos *subclusters* descritos (Figura 27).

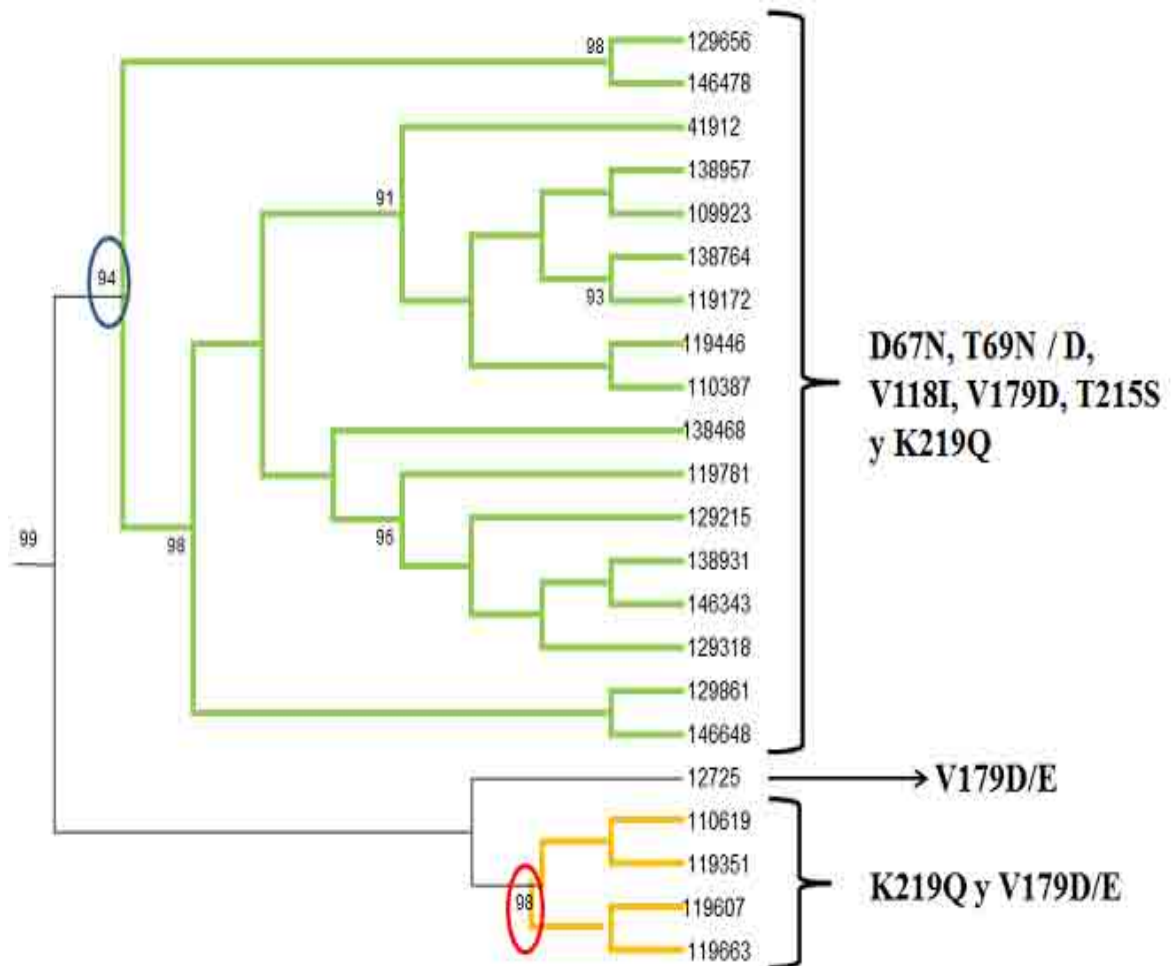


Figura 27. Representación gráfica de la topología del árbol filogenético de la CT43

CT45:

La CT45, con un valor de *bootstrap* del 99%, está compuesta por 5 pacientes que estaban infectados por cepas virales pertenecientes al subtipo B. Todos HSH con una mediana de edad media de 53 años (48-57). Cuatro eran españoles y uno británico. Dos pacientes fueron diagnosticados en 2006 y los otros 3 en 2004, 2009 y 2014. La mediana de linfocitos CD4 fue de 216 células/ μ L (25-492) y la de carga viral de 5,4 log (4,6-6,3). Tan solo hubo un paciente seroconvertor reciente (10,0 meses). Cuatro tenían un diagnóstico tardío y dos se presentaron como casos de SIDA. Ninguno de los pacientes portaba cepas virales con mutaciones de resistencia.

CT49:

La CT49, con un valor de *bootstrap* del 99%, está compuesta por 7 pacientes que presentaban cepas virales pertenecientes al subtipo B. Cinco eran HSH, un varón HTX y una mujer. La mediana de edad fue de 45 años (36-61). Seis españoles y uno austriaco. En 2006 fueron diagnosticados 3 casos y los otros 4 entre 2011 y 2015. La mediana de linfocitos CD4 fue de 484 células/ μ L (135-1014) y la de carga viral de 5,0 log (4,8-5,5). Dos pacientes eran seroconvertores y 4 diagnósticos tardíos. No hubo ni casos de SIDA ni se detectaron cepas virales con mutaciones de resistencia.

CT52:

La CT52, con un valor de *bootstrap* del 99%, está compuesta por 5 pacientes que estaban infectados por cepas virales pertenecientes al subtipo B. Todos eran HSH y españoles con una mediana de edad de 42 años (33-51). Dos pacientes fueron diagnosticados en 2010 y tres en 2004, 2007 y 2009. La mediana de linfocitos CD4 fue de 347 células/ μ L (145-545) y la de carga viral de 5,6 log (4,8-6,2). Tres pacientes eran seroconvertores y hubo dos diagnósticos tardíos y dos casos de SIDA (una criptococosis y una NPJ). Ninguno portaba cepas virales con mutaciones de resistencia. Los dos pacientes diagnosticados en 2010 se agruparon en un *subcluster* con un valor de *bootstrap* del 99%.

En la Tabla 31 se resumen las principales características de las 17 CT que hemos analizado en nuestro estudio.

Resultados

Tabla 31. Resumen de las principales características de las CTs analizadas en nuestro estudio.

CT	Bootstrap	Nº pacientes	Periodo de diagnóstico	Categoría transmisión	Edad (IQR)	Procedencia	Subtipo	Mutaciones resistencia
3	100%	21	2012-2015	HSH (21)	32 (26-36)	España (19), Sudamérica (2)	CRF19	G190A
4	98%	39	2006-2015	HSH (37), HTX (2)	39 (32-42)	España (37), Sudamérica (1), Otros países europeos (1)	CRF51	K103N, G190A, K103S, K101E, V179D, T69N
10	100%	7	2010-2014	HSH (7)	38 (31-46)	España (3), Sudamérica (4)	B	-
11	92%	8	2006, 2012-2014	HSH (7), Desconocida (1)	34 (27-39)	España (7), Sudamérica (1)	B	-
12	100%	7	2013-2015	HSH (4), HTX (3)	30 (20-37)	España (4), Otros países europeos (2), Sudamérica (1)	B	-
17	98%	17	2007-2014	HSH (16), Desconocida (1)	41 (31-54)	España (16), Sudamérica (1)	B	K103N
21	96%	29	2004-2015	HSH (28), HTX (1)	35 (30-37)	España (23), Sudamérica (3), Otros países europeos (3)	B	-
26	100%	5	2004-2005	HSH (4), HTX (1)	49 (43-55)	España (4), Sudamérica (1)	B	-
29	90%	90	2004-2015	HSH (79), HTX(9), Desconocida (2)	40 (32-47)	España (72), Sudamérica (8), Otros países europeos (7), África (3)	B	M46L, V106A, K103N, V179D
30	98%	9	2004-2015	HSH (7), HTX (2)	42 (36-53)	España (8), Otros países de Europa (1)	B	-
34	95%	14	2006-2013	HSH (14)	36 (31-42)	España (14)	B	-
36	96%	77	2004-2015	HTX (38), HSH (35), UDVP (3), Desconocida (1)	43 (35-51)	España (38), Sudamérica (16), Otros países de Europa (12), África (9), Asia (2)	Varios	V106A, K103N, M46I/L, P225H, M184V*
39	100%	6	2009-2015	HSH (6)	38 (28-48)	España (6)	B	-
43	99%	22	2007-2015	HSH (22)	45 (38-50)	España (20), Sudamérica (2)	B	D67N, T69N/D, V118I, V179D, T215S, K219Q
45	99%	5	2004-2014	HSH (5)	53 (48-57)	España (4), Otros países de Europa (1)	B	-
49	99%	7	2006-2015	HSH (5), HTX (2)	45 (36-61)	España (6), Otros países de Europa (1)	B	-
52	99%	5	2004-2010	HSH (5)	42 (33-51)	España (5)	B	-

*Se nombran las principales mutaciones de relevancia detectadas en la CT36

6. DISCUSIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

6. DISCUSIÓN

En España hay aproximadamente 150.000 infectados por el VIH-1⁹⁸. Los datos obtenidos a través del sistema de información sobre nuevos diagnósticos de VIH-1 (SINIVIH) son la mejor aproximación a la incidencia del VIH-1 de que se dispone, mostrando en la actualidad una tasa de nuevas infecciones de 7,25 por 100.000 habitantes⁹⁹, similar a la de países de nuestro entorno, como Francia, Bélgica o Irlanda, pero superior a la media del conjunto de países de la Unión Europea¹⁰⁰.

Al igual que en el resto de países de Europa occidental, también en España los sujetos más afectados pertenecen al sexo masculino y dentro de la categoría de transmisión, a HSH¹⁰¹⁻¹⁰³. La transmisión por vía parenteral, muy frecuente hasta finales de los años 90 del pasado siglo¹⁰⁴ ha pasado a ser testimonial. Estas características son similares a las observadas en nuestro estudio, con un incremento, especialmente en el segundo periodo, del porcentaje de varones y de HSH.

España se ha convertido en los últimos años en país receptor de inmigración, lo que ha incrementado a nivel nacional el número de pacientes extranjeros con infección por el VIH-1, suponiendo el 32% de los nuevos diagnósticos realizados en 2014⁹⁹. El impacto de estos movimientos migratorios se ve también reflejado en nuestro trabajo, en el que más del 25% de los nuevos diagnósticos de VIH-1 registrados son extranjeros, hasta de 43 nacionalidades diferentes. Destaca en nuestra población de estudio el importante porcentaje de pacientes de origen sudamericano por encima del resto.

En nuestro país, la inmigración latinoamericana es muy relevante y tiene un fuerte impacto en la transmisión HSH¹⁰⁵, a diferencia de lo que ocurre en otros países europeos donde los inmigrantes infectados son mayoritariamente subsaharianos. En nuestro trabajo, a diferencia también de lo observado en otras series⁹⁴, encontramos en segundo lugar a pacientes procedentes del resto de Europa por encima de los sujetos de origen africano.

En el momento del diagnóstico, uno de cada cinco pacientes tenía una enfermedad oportunista definitoria de SIDA, porcentaje similar a estudios previos de nuestro grupo¹⁰⁶. El 49,1% fueron diagnósticos tardíos, con una cifra de linfocitos CD4 por debajo de 350 células/ μ L, similar al resto de España y de otros países europeos^{102,107}. Estos datos han mejorado en el segundo periodo, con menor porcentaje de diagnósticos tardíos, menos casos de SIDA al diagnóstico y un incremento de

seroconvertidores recientes. Por su parte, la edad al diagnóstico se mantuvo sin variación significativa a lo largo de todo el estudio.

El análisis de las resistencias a los diferentes fármacos antirretrovirales en nuevos diagnósticos de VIH-1 muestra resultados diversos en relación a prevalencia, incidencia y tasas, debido a las poblaciones estudiadas y a la metodología empleada¹⁰⁶. La vigilancia de la transmisión dinámica de resistencias primarias en pacientes recién diagnosticados es de suma importancia para frenar la aparición y propagación de variantes resistentes en una población, con implicaciones directas en las políticas y recomendaciones de gestión del VIH-1¹⁰⁸.

Nuestro estudio sobre la diversidad del VIH-1 y TDR en los nuevos diagnósticos a lo largo de los años 2004 a 2015, ha mostrado una prevalencia general del 15,6%, observándose un incremento en el segundo periodo (12,0% vs. 18,5%). Esta tasa es mayor a la mostrada por otras series españolas y comunitarias que comentamos a continuación. En Estados Unidos y Europa occidental, la prevalencia de resistencias a los fármacos antirretrovirales oscila entre el 10% y el 15%¹⁰⁹⁻¹¹⁰. Diversos trabajos europeos han puesto de manifiesto una clara tendencia hacia la reducción de la tasa de transmisión de resistencias, que parece haberse estabilizado en torno al 10%¹¹¹⁻¹¹⁵. En España, estudios realizados a nivel nacional en diferentes periodos de tiempo, muestran una prevalencia que oscila entre un 10-14%^{74,94,116}. Los análisis llevados a cabo en el seno de la CoRIS^{84-85,117} muestran una prevalencia de resistencias en torno al 8,5%. Destacamos, por último, un estudio realizado en nuestra comunidad autónoma que incluyó 693 pacientes naïve de Granada, Almería y Jaén, durante el periodo 2005-2012⁹⁶, siendo la prevalencia de resistencias del 11,0%.

En nuestro trabajo no observamos esa tendencia hacia una disminución en la TDR mostrada en otros. Es más, si comparamos nuestra prevalencia de resistencias primarias para cada familia de antirretrovirales [ITINN (10,1%), ITIAN (5,0%) e IP (2,2%)] con un estudio nacional realizado en la CoRIS en 2011⁸⁵, los porcentajes son prácticamente similares excepto para los ITINN, donde observamos un porcentaje mayor en nuestro caso (10,1% vs.4%).

Durante nuestro periodo de estudio, no hemos observado un mayor incremento de resistencias primarias globalmente en ninguno de los tres grupos de fármacos. No obstante, si consideramos mutaciones concretas, sí que ha habido un incremento en algunas para los ITIAN (M41L, D67N, T69D/N y la K219E/Q) así como en la G190A

de los ITINN. Tanto unas como otras son mutaciones presentes en pacientes asociados en *clusters* o CTs surgidas en el segundo periodo de estudio. Con respecto a mutaciones para los IPs, la F53L y la L90M han disminuido en el segundo periodo.

A la hora de determinar la influencia que podrían tener las diferentes características basales en la presencia o no de resistencias primarias en nuestro trabajo, observamos, cómo al igual que en otros estudios, se asociaba a pacientes seroconvertidores¹⁰⁶.

En cuanto a la frecuencia de las mutaciones detectadas en nuestros pacientes, aparte de las mencionadas anteriormente, debemos destacar la elevada prevalencia que existe en nuestra cohorte de la K103N (4,6%) y la escasa presencia de la M184I/V (0,8%), al igual que los datos observados en las series presentadas por Romero et al¹¹⁸ y Mendoza et al¹¹⁶.

Por otra parte, durante los años que comprende nuestro trabajo, se han utilizado diferentes técnicas comerciales para la detección de resistencias genotípicas del VIH-1. La secuenciación tipo Sanger se complementó con la pirosecuenciación en el año 2015. La ventaja de esta última técnica es la capacidad para detectar mutaciones de resistencia a niveles incluso del 1%¹¹⁹, especialmente para la familia de los ITINN¹²⁰. Sin embargo, las recomendaciones actuales no incluyen de momento la necesidad de utilizar la secuenciación masiva para estudios de transmisión de resistencias. En nuestro caso, tampoco obtuvimos ninguna ventaja añadida al utilizar esta técnica, pues no se detectó ninguna variante minoritaria de interés, ni supuso un aumento en la prevalencia de resistencias a ninguna familia de antirretrovirales.

El subtipo del VIH-1 tiene gran importancia clínica. La epidemia actual del VIH-1 se caracteriza por un panorama complejo, con una dinámica que se orienta de forma creciente hacia nuevos y más complicados recombinantes del virus¹²¹. Este incremento en la prevalencia y heterogeneidad de variantes diferentes al subtipo B ocurre también en nuestro país¹². Esta expansión y emergencia de nuevas CRFs y URFs, resultado de coinfecciones y/o superinfecciones, dificulta la identificación de las variantes no-B del VIH-1.

En este trabajo hemos comparado la sensibilidad de tres métodos automáticos de subtipado con el análisis filogenético, considerado clásicamente como la técnica *gold standard*. La filogenia, tanto en este apartado como posteriormente para determinar las

cadena de transmisión (CT), fue inferida exclusivamente por el método de Máxima verosimilitud (ML) y la probabilidad posterior de un nodo se basó en altos valores de *bootstrap*, establecidos exactamente en cada caso. La confianza en los *clusters* formados, aun usando criterios bastante restrictivos desde el principio, especialmente en la definición de las CTs (valor de *bootstrap* $\geq 90\%$), hubiera requerido de una segunda reconstrucción filogenética que evaluara dicha probabilidad. Así, esta nueva filogenia podría haber sido realizada por el mismo método ML pero tomando como corte un valor mayor de *bootstrap* o bien haber empleado un método bayesiano, considerando posteriormente solo los nodos con una probabilidad superior a 0,90-0,95. Sin embargo, este requerimiento, por tiempo y recursos computacionales, se escapa del alcance de esta tesis, pero será considerado para la publicación posterior de los resultados.

El estudio filogenético incluyó las secuencias de nuestros pacientes y al menos dos de referencia para los diversos subtipos puros y las 72 CRFs descritas en el momento de inicio del trabajo.

Cada una de las tres herramientas automáticas está basada en un criterio de clasificación diferente: COMET tiene un fundamento estadístico⁸¹, Geno2pheno se basa en parámetros de similaridad¹²² y REGA posee un fundamento filogenético¹²³⁻¹²⁴.

Los tres métodos rápidos clasificaron correctamente la mayoría de secuencias del subtipo B. Éste sigue siendo el subtipo más prevalente en Europa occidental⁶⁹ y en nuestro país^{12,96}. La sobrerrepresentación del subtipo B en nuestra población de infectados por el VIH-1, hace que la sensibilidad de las herramientas automáticas para detectarlo sea bastante alta en general, como ya se ha visto en otros estudios⁸⁶.

No obstante, el porcentaje de secuencias que cada método automático asignaba al mismo variaba sustancialmente ($p < 0,001$): la versión 3.0 de REGA mostró mayor concordancia con el análisis filogenético, con porcentajes en torno al 70%. COMET y la versión 3.4 de Geno2pheno clasificaron más del 80% de las secuencias como subtipo B. Por tanto, la sobreestimación de esta variante en nuestra cohorte es bastante mayor con estas dos últimas herramientas. En contraposición, REGA sería el método automático que menor tasa de falsos subtipos B genera, como ya se había visto previamente⁸⁶.

La diversidad de variantes no-B que muestra la filogenia y que, en mayor o menor medida reflejan el resto de herramientas automáticas, está en concordancia con el

cambio de tendencia que se observa en la epidemia del VIH-1 en nuestro país, donde se han incrementado los nuevos diagnósticos de subtipos no-B^{12,85}.

Mediante el análisis filogenético se identificaron secuencias pertenecientes a 5 subtipos no-B puros: A1, C, F1, F2 y G. Mención especial merece el subtipo D, ya que aunque COMET con una secuencia, y Geno2pheno con 17 lo detectaban, tal asignación no encontraba correspondencia filogenética y se trataba, por tanto, de falsos positivos. Este error de subtipado, clasificando erróneamente como subtipo D secuencias que no lo eran, podría tener consecuencias clínicas importantes, al considerarse dicha variante más patogénica que otras¹²⁵.

Al realizar el análisis filogenético, 148 secuencias se agrupaban dentro de 23 CRFs diferentes, lo que representaba el 74,7% de las variantes no-B y el 82,6% de las secuencias recombinantes. El número de secuencias adscritas a una CRF conocida era inferior por cualquiera de los métodos rápidos: COMET asignó 41 secuencias a 7 CRFs diferentes (31,06% de las variantes no-B); Geno2pheno v3.4 asignaba 59 secuencias (47,5% de subtipos no-B) a 8 CRFs distintas y REGA identificaba 77 secuencias (41,6% de las variantes no-B) como recombinantes adscritas a 9 CRFs diferentes.

Si nos centramos en las variantes no-B en su conjunto, volvemos a encontrar que REGA, con una sensibilidad de más del doble a la mostrada por las otras dos herramientas, es la que concuerda en mayor medida con el análisis filogenético. Es más, es el único método automático capaz de identificar todos los casos, por ejemplo, del recombinante complejo CRF19_cpx. En relación a esta forma recombinante, 17 de los pacientes portadores de la misma fueron asignados por Geno2pheno al subtipo D, poniendo de manifiesto una limitación ya señalada anteriormente para esta herramienta, la de sobreestimar este subtipo¹²⁶.

La superioridad de REGA sobre los otros métodos automáticos para la identificación de las formas no-B contrasta en parte con lo mostrado en el trabajo de Switzer W et al¹²⁷ donde presentan una mayor concordancia con la filogenia de COMET vs. REGA y SCUEAL (otra herramienta basada en criterios filogenéticos). También es destacable que Geno2pheno y EuResist (http://engine.euresist.org/data_analysis/), ambas basadas en criterios de similaridad, muestran una sensibilidad del 100% para la detección de las variantes no-B en el estudio de Yebra et al⁸⁶. Sin embargo, hay que puntualizar que en este último trabajo la versión de REGA que emplearon es una anterior a la que nosotros hemos usado (la v3.0), que ha supuesto

mejoras significativas en la capacidad general de subtipado en comparación con la previa⁸⁷.

Respecto a las distintas versiones de REGA, debemos destacar que a pesar de su mayor concordancia con los resultados de la filogenia, la base de datos con la que trabaja la herramienta no presenta una actualización continua para las CRFs. Si como venimos observando, la descripción de formas recombinantes nuevas crece aceleradamente en nuestra población^{12,85,128}, esto supone una importante limitación. Así, la versión 3.0, la más actual, comprende hasta la CRF47_BF⁸⁷, si bien recientemente se ha presentado ya la CRF89_BF¹²⁹. Es, por ello, que solo tras la filogenia realizada *ad hoc*, en la cual incluimos hasta la CRF72_BF, pudimos asignar 50 secuencias a su forma recombinante correspondiente. Entre ellas, y constituyendo la CRF más prevalente en nuestra cohorte (5,8% del total de pacientes), destacaba la CRF51_01B, que representaba casi un tercio de todas las CRFs presentes (29,7%).

El estudio realizado entre 2004-2008 en la cohorte española CoRIS así como otros a nivel más local mostró que la CRF02_AG constituía la forma recombinante más prevalente^{12,128}. En nuestra población, esta CRF como tal afecta sólo a un 1,8% de los pacientes y supone un 7% dentro de las variantes no-B.

Zhang et al¹²¹ señalaron que la CRF02_AG era un participante activo en la generación de nuevos y más complejos recombinantes debido a una historia evolutiva más extensa, fruto de un origen más remoto, y a su alta capacidad replicativa y prevalencia¹³⁰⁻¹³². Este escenario, aunque es más común en el continente africano, podría ser aplicable también a nuestra área, donde hemos identificado las variantes CRF30_0206, CRF36_cpx, CRF43_02G y CRF63_02A1 en las que participa la CRF02_AG.

Si consideramos todas estas variantes mencionadas en el párrafo anterior, podríamos afirmar que la CRF02_AG de forma independiente y formando parte de otros recombinantes está presente en un total de 34 pacientes, lo que supone un 17,1% de las infecciones por variantes no-B. Este porcentaje está más próximo al encontrado en el estudio de Vega et al⁹⁴, con 95 CRF02_AG y 8 CRF43_02G de 472 formas no-B (21,8%), en el período 2004-2012.

El origen de los pacientes portadores de la CRF02_AG y de las variantes recombinantes seguía siendo mayormente inmigrante, aunque encontramos un

porcentaje importante de población autóctona con estas CRFs. 10 de los 14 casos con la CRF02_AG y 20 pacientes con las CRF36_cpx, CRF43_02G y CRF63_02A1 eran inmigrantes. 22 de los 34 casos (64,7%) procedían del África subsahariana, especialmente de Nigeria (14 pacientes, 41,1%). Estos resultados superan a los observados en la población española de VIH-1^{12,85}.

En nuestro estudio filogenético encontramos 31 secuencias recombinantes (17,3% de los recombinantes) que no podían ser asignadas a ninguna CRF conocido y que presentaban eventos de recombinación según determinábamos con el programa Simplot. Estas secuencias las denominamos como “Nueva CRF/URF” y así las hemos considerado para nuestros cálculos. Aunque podríamos clasificarlas como URF no quisimos descartar la posibilidad de que se tratara de una CRF no incluida en nuestro análisis pero ya descrita (como mencionamos anteriormente incluimos hasta la CRF72 y ya se han caracterizado hasta 89 CRFs distintas). La denominación como nueva CRF/URF también contemplaba la posibilidad de que se tratara de una CRF no definida aún, pero para ello necesitaríamos haber llevado a cabo estudios de recombinación más exhaustivos, a ser posible del genoma completo, en el que coincidieran los resultados de al menos tres pacientes no relacionados epidemiológicamente, lo cual sobrepasaba con creces el cometido de esta tesis.

Hemos analizado las características epidemiológicas de los pacientes portadores de estas 31 secuencias. En relación a la categoría de transmisión, encontramos una alta concordancia con lo observado en la cohorte española¹²: el 51,6% de los pacientes se habían infectado por contactos heterosexuales de riesgo (destacar que 12 de los casos eran mujeres). A diferencia del trabajo citado, el 61,2% de nuestras secuencias no clasificadas pertenecía a pacientes españoles.

Hemos encontrado que otros estudios llevados a cabo¹²⁷ ponen de manifiesto también el escaso poder de las tres técnicas automáticas COMET, REGA y SCUEAL, para identificar URFs y subtipos no-B menos frecuentes. En nuestro trabajo posiblemente la sobreestimación que REGA hace de nuevas CRFs ó URFs, detectando más del doble (8,7%) de lo que realmente obtenemos por filogenia (4,1%), tenga su explicación, por un lado, en el mayor potencial para asignar una secuencia a un subtipo o CRF conocidas, ya comentado anteriormente, pero por otro, en la incapacidad para asociar secuencias que quedan claramente fuera de ese conjunto pero que serían formas recombinantes ya descritas no contempladas en su base de datos.

En resumen, dependiendo de la herramienta automática usada, los resultados de epidemiología molecular serían diferentes, sobre todo, la prevalencia de las variantes no-B, y dentro de ellas, de las formas recombinantes. La versión 3.0 de REGA es el método automático que presentó mayor concordancia con la filogenia realizada. No obstante, la principal limitación, al igual que Geno2pheno es la base con la que se trabaja y la necesidad de actualizaciones periódicas⁸⁶.

Por lo tanto según los resultados obtenidos por filogenia, dentro de nuestra población, 559 pacientes (73,8%) estaban infectados por el subtipo B, y 198 por subtipos no-B (26,2%), cifras prácticamente similares a las publicadas por nuestro grupo de estudio en 2008¹⁰⁶. Como ya se ha mencionado anteriormente, en España así como en otros países europeos la prevalencia de nuevos diagnósticos por subtipos no-B ha ido en aumento en los últimos años^{128,133-134}, manteniéndose el porcentaje de estas variantes por encima del 15%⁸⁵.

Cuando analizamos la prevalencia de subtipos no-B en diferentes grupos de población según la nacionalidad, observamos cómo en el segundo periodo se produce un aumento de la prevalencia en la población española, coincidiendo este dato con una tendencia observada en otros estudios⁶⁹.

De acuerdo a lo visto a nivel nacional⁸⁵, cuando nosotros analizamos la distribución de los subtipos no-B, también observamos que las CRFs fueron más frecuentes (82,6%) que los subtipos no-B puros. Dentro de las formas recombinantes, en la mayoría de los estudios^{74,85,135-136} se encuentra una mayor prevalencia de la CRF02_AG si bien en nuestro estudio es la CRF51_01B la que observamos con mayor frecuencia (5,8%) seguida de la CRF19_cpx (2,8%).

Otro factor importante en relación a los subtipos no B es la presencia de mutaciones de resistencia primaria, coincidiendo con otros estudios publicados¹³⁷⁻¹³⁸, nuestra población presentó una prevalencia de TDR mayor en los pacientes infectados por subtipos no-B, fundamentalmente por la presencia de mutaciones a ITINN en los casos con variantes como la CRF51_01B (K103N) o la CRF19_cpx (G190A).

Uno de los resultados más interesantes de nuestro trabajo ha sido la detección de numerosas cadenas de transmisión (CT) en nuestra población. De los 757 pacientes incluidos, 451(59,6%) se agruparon en 53 CTs diferentes tomando como criterio de inclusión un valor de *bootstrap* $\geq 90\%$. Hillis et al¹³⁹ afirman que valores por encima del

70% serían fiables a la hora de definir una cadena de transmisión; sin embargo, otros trabajos consultados¹⁴⁰⁻¹⁴¹ partían de valores mayores y ésta ha sido nuestra opción con el objeto de afinar en las asociaciones obtenidas en cuanto a características clínico-epidemiológicas y virológicas. A pesar de estos criterios restrictivos de definición de una CT, es sorprendente el porcentaje tan alto de individuos que se agrupan en *clusters*, comparado con los obtenidos tanto a nivel nacional como de forma regional⁹⁴⁻⁹⁶.

Estas CTs estaban formadas principalmente por pacientes HSH de origen español, seroconvertores, sin diagnóstico de SIDA, con mutaciones de resistencia primarias y fueron más frecuentes en el segundo periodo (2010-2015) del estudio.

Los pacientes UDVP estuvieron asociados a CT en menor proporción, lo que refleja el gran cambio en la sub-epidemia de UDVP desde los años noventa, cuando esa categoría de transmisión constituía la principal vía de infección por el VIH-1 en España. Por otra parte, predominaron las cadenas de transmisión formadas por pacientes de origen español o latinoamericano formadas por pacientes que son HSH.

El 54,5% de los pacientes infectados con el subtipo B se agrupaban en CTs. Esta cifra es relativamente alta, comparada con la presentada en otros estudios, donde oscilaba entre el 15% y el 50%¹⁴²⁻¹⁴⁵. En las cadenas de transmisión del VIH-1 que implicaban HSH, el subtipo B fue más frecuente mientras que para los subtipos no-B el porcentaje de HTX fue mayor como ya se ha visto también anteriormente¹³⁵.

Entre los pacientes infectados por subtipos no-B, el 73,7% se agrupaba en alguna CT, un porcentaje mayor con respecto al de los estudios mencionados¹⁴²⁻¹⁴⁵, reflejando el elevado impacto epidemiológico y la importancia en la dinámica de transmisión de la infección que estas variantes tienen en nuestra población con respecto a otras zonas. Así, el hecho de estar infectado por un subtipo no-B, junto con el de presentar resistencia a alguna familia de antirretrovirales, se relacionaba con sujetos asociados en una CT.

Al analizar las mutaciones para cada familia de antirretrovirales presentes en una CT, para los ITIAN se observaron en *clusters* con más frecuencia las mutaciones T69D/N, K219E/Q y D67N. Destacamos la CT43 formada por 22 pacientes con subtipo B en la que 17 se agruparon en un *subcluster* con valor de *bootstrap* del 94% presentando el siguiente patrón de mutaciones de resistencias: D67N, T69N/D, V118I, V179D, T215S y K219Q⁹⁷.

En cuanto a las mutaciones de resistencia a ITINN, las que se observaron con mayor frecuencia en alguna CT fueron la K103N y la G190A. En la CT3, formada por 21 pacientes infectados por el subtipo CRF19_cpx, 16 presentaron la mutación G190A y en la CT4, constituida por 39 pacientes infectados por la variante CRF51_01B, 20 portaban la mutación K103N, reflejando la presencia en nuestra área de CT con una rápida y eficaz propagación. En el caso de mutaciones a los IP no había ninguna mutación que fuera más frecuente en las CT.

De los pacientes asociados en *clusters*, 368 (81,5%) formaban parte de una CT con cinco o más individuos. En concreto, eran 17 CTs las compuestas por este número mínimo de pacientes y las que se analizaron más pormenorizadamente. Un estudio realizado en Reino Unido destaca que hasta un 29% de la población se agrupa en grandes CTs con más de 10 individuos¹⁴⁶. Si realizáramos este mismo análisis en nuestra cohorte, el 40,8% de nuestra población se agrupó en 8 CTs de más de 10 individuos. Esto vuelve a poner de manifiesto la alta frecuencia de los pacientes de nuestra área a asociarse en cadenas y la destacable dimensión de estas CTs.

Tradicionalmente, la mayor prevalencia de subtipos no-B se ha asociado a población inmigrante, tanto a varones heterosexuales como a mujeres⁶⁹. Así, la CT36 agrupa entre sí a 77 pacientes (55 hombres y 22 mujeres) infectados por diferentes variantes no-B, de los cuales 39 eran inmigrantes, 49,4% eran HTX y el 45,5% HSH.

Sin embargo, diferentes estudios publicados recientemente¹⁴⁷⁻¹⁴⁸, destacan que se está observando un aumento de variantes no-B en otros grupos en los que antes estaban ausentes, como las poblaciones europeas no inmigrantes y HSH, lo cual también ocurre en nuestro trabajo. Si nos fijamos, por ejemplo, en la CT3, como se mencionó antes los 21 pacientes presentaban el subtipo CRF19_CPX, y todos ellos eran HSH, 19 además españoles. También observamos esta impresión en la CT36, en la que prácticamente el 50% de los individuos que la componen son autóctonos y HSH.

En un estudio realizado en Ginebra (Suiza) para evaluar la tendencia de transmisión de mutaciones de resistencias y el impacto del TAR en nuevos diagnósticos¹⁴⁹, afirman que cuando un pequeño grupo de transmisión se encuentra dentro de uno más grande, solamente debe considerarse este último. Sin embargo, varios estudios han demostrado que dentro de una CT pueden existir *subclusters* de transmisión y es más, en ellos se puede encontrar una replicación preferencial de ciertas cepas virales con mutaciones de resistencias (Vega. et al⁹⁴).

En nuestro trabajo, son varias las CTs en las que pudimos detectar la presencia de *subclusters*, destacando la CT36 donde los 77 pacientes se agrupaban con un valor de *bootstrap* del 96%. Dentro de esta CT existen 15 *subclusters* diferentes, también definidos por valores de *bootstrap* superiores al 90%, donde la cepa de cada uno de ellos pertenece a una forma recombinante o subtipo no-B puro diferente, lo cual sugiere una divergencia reciente hacia nuevas cadenas de transmisión.

Dentro de la misma CT36 encontramos algunos pacientes agrupados en *subclusters* compartiendo mutaciones de resistencias: en el *subcluster* K, que asociaba 16 pacientes, todos presentaron la mutación accesoria K20I, que es el aminoácido consenso en el subtipo G y CRF02_AG, mientras que en los subtipos B y C es una mutación accesoria seleccionada por IP que reduce la susceptibilidad a nelfinavir. Por su parte, en el *subcluster* L de esta misma CT, se podían distinguir a su vez 3 subgrupos: L1, con 3 pacientes portando la mutación V106A, L2 constituido por 4 pacientes con la mutación M46IL y L3 formado por 4 pacientes que presentan la mutación A62V, mutación accesoria que está muy extendida en el VIH-1 del subtipo A en los países de la antigua Unión Soviética¹⁵⁰ (de estos 4 pacientes, es interesante destacar que dos hombres eran de nacionalidad rusa y UDVP).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

7. CONCLUSIONES



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

7. CONCLUSIONES

1. Los nuevos diagnósticos de infección por el VIH-1 se caracterizan por un predominio en varones, y una categoría de transmisión sexual, fundamentalmente HSH. A lo largo de los años en los que tuvo lugar nuestro trabajo observamos una disminución del diagnóstico tardío, menos casos de SIDA y un mayor porcentaje de seroconvertidores recientes.
2. La tasa de prevalencia de resistencias primarias fue del 15,6%, mayor que en otros estudios de nuestro entorno.
3. La transmisión de mutaciones de resistencia primarias se ha incrementado en el segundo periodo del estudio, destacando las mutaciones D67N, T69D/N, K219Q y G190A.
4. La prevalencia de la mutación K103N ha sido del 4,6%, manteniéndose prácticamente constante en ambos periodos.
5. En nuestra cohorte, la herramienta automática que presentaba mayor concordancia con el análisis filogenético y, por tanto, mayor utilidad para el subtipado, fue la versión 3.0 de REGA.
6. Más de la mitad de las variantes no-B se aglutinan en el segundo periodo, donde casi uno de cada tres nuevos diagnósticos presenta una variante no-B. Este cambio de tendencia se observa también a nivel nacional.
7. Entre los subtipos no-B, fueron las formas recombinantes más frecuentes que los subtipos no-B puro, al contrario de lo que se observa en la mayoría de los estudios donde son más frecuente los subtipos no-B puros.
8. El 4% de secuencias no se pudo asignar a ningún subtipo o CRF conocido. Eran formas recombinantes complejas probablemente CRFs nuevas no definidas aún.
9. Más de la mitad de la población se agrupó en CTs, ocho de ellas con más de 10 sujetos
10. La mayoría de los sujetos asociados a cadenas de transmisión eran HSH.
11. Se encontraron cadenas transmisión que asociaban entre sí pacientes diagnosticados a lo largo de todo el periodo del estudio.
12. Hubo dos cadenas de transmisión de dos subtipos no-B peculiares, la CRF19_cpx y la CRF51_01B, con más de 20 individuos cada una, en ambos casos asociadas a mutaciones de resistencia.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

8. BIBLIOGRAFÍA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

BIBLIOGRAFÍA

1. Lever AM, Berkhout B. 2008 Nobel prize in medicine for discoverers of HIV. *Retrovirology*. 2008;5:91.
2. de Béthune MP. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: a review of the last 20 years (1989-2009). *Antiviral Res*. 2010;85(1):75-90.
3. Kumar P, Murphy FA. Who is this man? Francis Peyton Rous. *Emerg Infect Dis*. 2013; 19(4):661-3.
4. Coffin JM, Fan H. The Discovery of Reverse Transcriptase. *Annu Rev Virol*. 2016;3(1):29-51.
5. Toro C, Rodés B, Aguilera A, Caballero E, Benito R, Bassani S, et al. Infecciones por VIH-2 y HTLV-I/II en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004; 22:177-82.
6. Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, et al. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science*. 2006;313:523-6.
7. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*. 1999;397:436-41.
8. Worobey M, Gemmel M, Teuwen DE, Haselkorn T, Kunstman K, Bunce M, et al. Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature*. 2008;455:661-4.
9. Delgado R. Características virológicas del VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:58-65.
10. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, et al. A human immunodeficiency virus derived from gorilla. *Nat Med*. 2009;15:871-2.
11. González-Alba JM, Rodríguez-Domínguez M, Mateos Lindemann ML. Determinación de la carga viral del VIH-1. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29 Suppl 3:47-50.
12. Yebra G, de Mulder M, Martín L, Rodríguez C, Labarga P, Viciano I et al. Cohort of the Spanish AIDS Research Network (CoRIS). Most HIV type 1 non-B infections in the Spanish cohort of antiretroviral treatment-naïve HIV-infected patients (CoRIS) are due to recombinant viruses. *J Clin Microbiol*. 2012; 50:407-13.

13. Kwong PD, Doyle ML, Casper DJ, Cicala C, Leavitt SA, Majeed S et al. HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature*. 2002; 420:678-82.
14. Zhu P, Liu J, Bess J Jr, Chertova E, Lifson JD, Grisé H et al. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature*. 2006; 44:847-52.
15. Campbell EM, Hope TJ. HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(8):471-83.
16. Myers G, Pavlakis G. Evolutionary potential of complex retroviruses. En: Levy J, eds. *The Retroviridae*. p1 New York, Plenum Press; 1992.
17. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim M.H. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*. 2002; 418:646-50.
18. Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature*. 1998; 391:397-401.
19. Guttman M, Kahn M, Garcia NK, Hu SL, Lee KK. Solution structure, conformational dynamics, and CD4-induced activation in full-length, glycosylated, monomeric HIV gp120. *J Virol*. 2012; 86:8750-64.
20. Waters L, Mandalia S, Randell P, Wildfire A, Gazzard B, Moyle G. The impact of HIV tropism on decreases in CD4 cell count, clinical progression, and subsequent response to a first antiretroviral therapy regimen. *Clin Infect Dis*. 2008;46:1617-23.
21. McClure M, Sommerfelt M, Marsh M et al. The pH independence of mammalian retrovirus infection. *J Gen Virol* 1990;71:767-73.
22. Bukrinsky M, Sharova N, McDonald T, Pushkarskaya T, Tarpley WG, Stevenson M. Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:6125-9.
23. Bukrinsky M, Sharova N, Dempsey M, Stanwick TL, Bukrinskaya AG, Haggerty S et al. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:6580-4.
24. Bukrinsky M, Haggerty S, Dempsey M, Sharova N, Adzhubel A, Spitz L et al. Nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature*. 1993; 365:666-669.

25. Heinzinger NK, Bukrinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Lee MA et al. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(15):7311-5.
26. Von Schwedler U, Kornbluth R, Trono D. The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:6992-6.
27. Gally P, Swingler S, Aiken C, Trono D. VIH-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. *Cell*. 1995;80:379-88.
28. Shih C, Stoye J, Coffin J. Highly preferred targets for retrovirus integration. *Cell*. 1988;53:531-7.
29. Pryciak P, Varmus H. Nucleosomes, DNA binding proteins, and DNA sequence modulate retroviral target site selection. *Cell*. 1992;69:769-80.
30. Goff S. Genetics of retroviral integration. *Annu Rev Genetics*. 1992; 26:527-44.
31. Serrao E, Engelman AN. Sites of retroviral DNA integration: From basic research to clinical applications. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2016;51:26-42.
32. Engelman A, Mizuuchi K, Craigie R. HIV-1 DNA integration: Mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell*. 1991;67:1211-21.
33. Frankel A, Young J. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:1-25.
34. Garnier L, Bowzard J, Wills J. Recent advances and remaining problems in HIV assembly. *AIDS*. 1998;12:S5-16.
35. Jabbar M. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein: roles in virus release and CD4 downregulation. *Curr Top Microb Immunol* 1995;193:107-20.
36. Strebel K, Daugherty D, Clouse K et al. The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature*. 1987;328:728-30.
37. Fisher A, Ensoli B, Ivanoff L et al. The sor gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro. *Science*. 1987;237:888-93.
38. Franke E, Yuan H, Luban J et al. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature*. 1994;372:359-62.

39. Thali M, Bukovsky A, Kondo E et al. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature*. 1994; 372:363-5.
40. Freskgard P, Bergenhem N, Jonsson B, Svensson M, Carlsson U. Isomerase and chaperone activity of prolyl isomerase in the folding of carbonic anhydrase. *Science*. 1992;258:466-8.
41. Starnes M, Rutherford S, Zucker C. Cyclophilins: a new family of proteins involved in intracellular folding. *Trends Cell Biol* 1992; 2:272-276.
42. Luban J. Absconding with chaperone: essential cyclophilin-Gag interaction in HIV-1 virions. *Cell*. 1996;87:1157-9.
43. Robb ML, Eller LA, Kibuuka H, Rono K, Maganga L, Nitayaphan S et al; RV 217 Study Team.. Prospective Study of Acute HIV-1 Infection in Adults in East Africa and Thailand. *N Engl J Med*. 2016;374:2120-30.
44. Medrano, L., Pérez, L., Cuevas, L.2001. Patogenia de la infección por el VIH- 1. En: *Salud pública y SIDA*. Francisco Bueno Cañigral y Rafael Nájera Morrondo. Ediciones Doyma, S. L. Madrid. España.
45. Aguilera Guirao A, Álvarez Estévez M, García García F, Reina González G, Rodríguez Martín C. Diagnóstico microbiológico de la infección por el VIH. 6a. García García F. (coordinador). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014.
46. García F, Álvarez M, Bernal C, Chueca N, Guillot V. Diagnóstico de laboratorio de la infección por el VIH, del tropismo viral y de las resistencias a los antirretrovirales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:297-307.
47. Kowalski J, Tu XM, Jia G, Pagano M. A comparative meta-analysis on the variability in test performance among FDA-licensed enzyme immunosorbent assays for HIV antibody testing. *J Clin Epidemiol* 2001; 54:448-461.
48. Mylonakis e, Paliou m, Greebough Tc et al. Report of a false-positive HIV test result and the potencial use of additional test in establishing HIV serostatus. *Arch Intern Med* 2000; 160:2386-2388.
49. Healy DS, Maskill TS, Howard TS, Armstrong VA, Bolton WV, Cooper GJ, et al.HIV-1 Western blot: development and assessment of testing to resolve indeterminatereactivity. *AIDS*. 1992;6:629-33.
50. Innogenetics. INNO-LIA HIV I/II score kit package insert. Innogenetics, Ghent, Belgium. 2011. 25431, v13.

51. Casey JM, Kim Y, Andersen PR. Human T-cell lymphotropic virus type III: immunologic characterization and primary structure analysis of the major internal protein p24. *J Virol*. 1985;55:417-23.
52. Executive summary of the GESIDA/National AIDS Plan Consensus Document on Antiretroviral Therapy in Adults Infected by the Human Immunodeficiency Virus (Updated January 2016). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016
53. Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, et al. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med*. 1987;317:185-191.
54. Delta: a randomised double-blind controlled trial comparing combinations of zidovudine plus didanosine or zalcitabine with zidovudine alone in HIV-infected individuals. Delta Coordinating Committee. *Lancet*. 1996;348:283- 1.
55. Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient study Investigators. *N Engl J Med* 1998;338:853-860.
56. Kassaye SG, Grossman Z, Balamane M, Johnston-White B, Liu C, Kumar P, Young M, Sneller MC, Sereti I, Dewar R, Rehm C, Meyer W 3rd, Shafer R, Katzenstein D, Maldarelli F. Transmitted HIV Drug Resistance Is High and Longstanding in Metropolitan Washington, DC. *Clin Infect Dis*. 2016; 63:836-43.
57. Shafer RW, Rhee S, Pillay D, Miller V, Sandstrom P, Schapiro JM, et al. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS*. 2007;21:215-23.
58. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, Kiuchi M, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS ONE*. 2009;4:e4724.
59. Smith K, Powers KA, Kashuba ADM, Cohen MS. HIV-1 treatment as prevention: The good, the bad, and the challenges. *Curr Opin HIV AIDS*. 2011;6:315-25.
60. Chamizo-López FJ, Gilarranz-Luengo R, Hernández-Febles M, Pena-López MJ. Evolución de la transmisión de cepas con resistencia a fármacos antirretrovirales en pacientes diagnosticados de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana en Gran Canaria en el período 2009-2012. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014; 32:695-6.

61. Gonzalez-Serna A, Min JE, Woods C, Chan D, Lima VD, Montaner JS, et al. Performance of HIV-1 drug resistance testing at low-level viremia and its ability to predict future virologic outcomes and viral evolution in treatment-naïve individuals. *Clin Infect Dis.* 2014;8:1165-73.
62. Santoro MM, Fabeni L, Armenia D, Alteri C, di Pinto D, Forbici F, et al. Reliability and clinical relevance of the HIV-1 drug resistance test in patients with low viremia levels. *Clin Infect Dis.* 2014;8:1156-64.
63. Álvarez Estévez M, Reina González G, Aguilera Guirao A, Rodríguez Martín C, García García F. Diagnóstico microbiológico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33:e44-52.
64. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents [Internet]. Bethesda (US): Office of AIDS Research Advisory Council(OARAC). Disponible en: <http://www.aidsinfo.nih.gov/>.
65. Günthard HF, Saag MS, Benson CA, del Rio C, Eron JJ, Gallant JE, et al. Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2016 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA.* 2016;316:191-210.
66. Ryom L, Boesecke C, Gisler V, Manzardo C, Rockstroh JK, Puoti M, et al. EACS Governing Board. Essentials from the 2015 European AIDS Clinical Society (EACS) guidelines for the treatment of adult HIV-positive persons. *HIV Med.* 2016;17:83-8.
67. Hué S, Clewley JP, Cane PA, Pillay D. HIV-1 pol gene variation is sufficient for reconstruction of transmissions in the era of antiretroviral therapy. *AIDS.* 2004;18(5):719-28.
68. Nájera R, Delgado E, Perez-Alvarez L, Thomson M.M. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. *AIDS.* 2002;16 Suppl 4:S3-16.
69. Beloukas A, Psarris A, Giannelou P, Kostaki E, Hatzakis A, Paraskevis D. Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Europe: An overview. *Infect Genet Evol.* 2016;46:180-189.
70. Paraskevis D, Nikolopoulos GK, Magiorkinis G, Hodges-Mameletzis I, Hatzakis A. The application of HIV molecular epidemiology to public health. *Infect Genet Evol.* 2016;46:159-68.
71. Holguín A, Alvarez A, Soriano V. Heterogeneous nature of HIV-1 recombinants spreading in Spain. *J Med Virol.* 2005;75:374-80.

72. Venner CM, Nankya I, Kyeyune F, Demers K, Kwok C, Chen PL, et al. Infecting HIV-1 Subtype Predicts Disease Progression in Women of Sub-Saharan Africa. *EBioMedicine*. 2016;13:305-14.
73. Holguín, A., López, M., Soriano, V. Reliability of rapid subtyping tools compared to that of phylogenetic analysis for characterization of human immunodeficiency virus type 1 non-B subtypes and recombinant forms. *J. Clin. Microbiol*. 2008;46:3896–3899.
74. Yebra G, de Mulder M, del Romero J, Rodríguez C, Holguín A. HIV-1 non-B subtypes: High transmitted NNRTI-resistance in Spain and impaired genotypic resistance interpretation due to variability. *Antiviral Res*. 2010; 85:409-17.
75. Thomson MM, Nájera R. Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update. *AIDS Rev*. 2005; 7(4):210-24.
76. Red de Investigación en Sida (RIS). Guía de resistencias a los antirretrovirales 2013.
77. Kuritzkes DR, Grant RM, Feorino P, Griswold M, Hoover M, Young R, et al. Performance characteristics of the TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit and the Opengene DNA Sequencing System. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(4):1594-9.
78. Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, and Nyren P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem*. 1996; 242(1): 84-9.
79. Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chim Acta*. 2006; 363(1-2):83-94.
80. Jarvie T, Harkins T. De novo assembly and genomic structural variation analysis with genome sequencer FLX 3K long-tag paired end reads. *Biotechniques*. 2008; 44(6):829-31.
81. Struck D, Lawyer G, Ternes AM, Schmit JC, Bercoff DP. COMET: adaptive context-based modeling for ultrafast HIV-1 subtype identification. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42(18):e144.
82. Lengauer T, Sing T. Bioinformatics-assisted anti-HIV therapy. *Nat Rev Microbiol*. 2006; 4(10):790-7.
83. Peña ACP, Faria NR, Imbrechts S, Libin P, Abecasis AB, Deforche K, et al. *Infectious Genetics and Evolution* 2013; 19:337-48.
84. Monge S, Guillot V, Alvarez M, Peña A, Viciano P, García-Bujalance S, et al. Cohort of the Spanish AIDS Research Network (CoRIS). Analysis of transmitted drug

resistance in Spain in the years 2007-2010 documents a decline in mutations to the non-nucleoside drug class. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18(11):E485-90.

85. García F, Pérez-Cachafeiro S, Guillot V, Alvarez M, Pérez-Romero P, Pérez-Elías MJ, et al. Cohort of the Spanish AIDS Research Network (CoRIS). Transmission of HIV drug resistance and non-B subtype distribution in the Spanish cohort of antiretroviral treatment naïve HIV-infected individuals (CoRIS). *Antiviral Res.* 2011; 91(2):150-3.

86. Yebra G, de Mulder M, Martín L, Pérez-Cachafeiro S, Rodríguez C, Labarga P, et al. Cohort of Spanish AIDS Research Network (CoRIS). Sensitivity of seven HIV subtyping tools differs among subtypes/recombinants in the Spanish cohort of naïve HIV-infected patients (CoRIS). *Antiviral Res.* 2011; 89:19-25.

87. Pineda-Peña AC, Faria NR, Imbrechts S, Libin P, Abecasis AB, Deforche K, et al. Automated subtyping of HIV-1 genetic sequences for clinical and surveillance purposes: performance evaluation of the new REGA version 3 and seven other tools. *Infect Genet Evol.* 2013; 19:337-348.

88. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research.* 1997; 25: 4876-4882.

89. Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol BiolEvol.* 2000; 17:540-52.

90. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *MolBiolEvol.* 2013: 2725-2729.

91. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. Fast Tree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol Biol Evol.* 2009; 26:1641-1650.

92. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. Fast Tree 2-approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One.* 2010; 5:e9490.

93. Miller MA, Schwartz T, Pickett BE, He S, Klem EB, Scheuermann RH, et al. A RESTful API for Access to Phylogenetic Tools via the CIPRES Science Gateway. *Evol Bioinform Online.* 2015; 11:43-8.

94. Vega Y, Delgado E, Fernández-García A, Cuevas MT, Thomson MM, Montero V, et al. Epidemiological Surveillance of HIV-1 Transmitted Drug Resistance in Spain in 2004-2012: Relevance of Transmission Clusters in the Propagation of Resistance Mutations. *PLoS One.* 2015; 10(5):e0125699.

95. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol.*1999; 73:152-160.
96. Pérez-Parra S, Chueca-Porcuna N, Álvarez-Estevez M, Pasquau J, Omar M, Collado A, et al. Los estudios de resistencias a antirretrovirales como herramienta para el análisis de los clusters de transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015; 33:603-8.
97. Viciano I, González-Domenech CM, Palacios R, Delgado M, Del Arco A, Tellez F, et al. Clinical, virological and phylogenetic characterization of a multiresistant HIV-1 strain outbreak in naïve patients in southern Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71:357-61.
98. WHO. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2015 (Internet). Disponible en: http://www.unaids.org/sites/default/files/country/documents/ESP_narrative_report_2016.pdf
99. Área de Vigilancia de VIH y Comportamientos de Riesgo. Vigilancia Epidemiológica del VIH y sida en España: Sistema de Información sobre Nuevos Diagnósticos de VIH y Registro Nacional de Casos de Sida. Plan Nacional sobre el Sida. S.G. de Promoción de la Salud y Epidemiología / Centro Nacional de Epidemiología. ISCIII. Madrid;Nov 2015. Disponible en: https://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/sida/vigilancia/InformeVIH_SIDA_2015.pdf
100. Marco A, Saiz de la Hoya P, García-Guerrero J; Grupo PREVALHEP. Multi-centre study of the prevalence of infection from HIV and associated factors in Spanish prisons. *Rev Esp Sanid Penit.* 2012; 14:19-27.
101. Díez M, Oliva J, Sánchez F, Vives N, Cevallos C, Izquierdo A; Grupo SINIVIH. Incidence of new HIV diagnoses in Spain, 2004-2009. *Gac Sanit.* 2012; 26(2):107-15.
102. European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Region Office for Europe. HIV/AIDS surveillance in Europe 2009. Stockholm: European Centre for Diseases Prevention and Control; 2010.
103. Grupo EpiVIH. Proyecto EPIVIH. Nuevos diagnósticos de infección por VIH en pacientes de una red de centros de diagnóstico de VIH, 2003-2008. Centro Nacional de Epidemiología. 2010.

104. Castilla J, Sobrino P, Lorenzo JM, Moreno C, Izquierdo A, Lezaun ME, et al. Present situation and future perspectives of the epidemic of HIV and AIDS in Spain. *An Sist Sanit Navar*. 2006; 29(1):13-25.
105. Díaz A, Junquera ML, Esteban V, et al. HIV/STI co-infection among men who have sex with men in Spain. *Euro Surveill*. 2009:14.
106. Palacios R, Viciano I, Pérez de Pedro I, de la Torre J, Ropero F, Fernández S, et al.; Grupo Malagueño para el Estudio de las Enfermedades Infecciosas. Prevalence of primary resistance mutations in patients with newly diagnosed HIV infection in the province of Málaga (Spain). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008; 26(3):141-5.
107. Oliva J, Galindo S, Vives N, et al. Retraso diagnóstico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28:583-9.
108. Sax, P.E., Islam, R., Walensky, R.P., Losina, E., Weinstein, M.C., Goldie, S.J. et al. Should resistance testing be performed for treatment-naïve HIV-infected patients? A cost-effectiveness analysis. *Clin Infect Dis*. 2005; 41: 1316-1323.
109. Little S, Holte S, Routy J, et al. Antiretroviral drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* 2002; 347:385-94.
110. Wensing A, Boucher C. Worldwide transmission of drug-resistant HIV. *AIDS Rev* 2003; 5:140-55.
111. Geretti AM. Epidemiology of antiretroviral drug resistance in drug-naïve persons. *Curr Opin Infect Dis*. 2007; 20(1):22-32.
112. UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance, Dolling D, Sabin C, Delpech V, Smit E, Pozniak A, et al. Time trends in drug resistant HIV-1 infections in the United Kingdom up to 2009: multicentre observational study. *BMJ*. 2012; 345:e5253.
113. Karlsson A, Bjorkman P, Bratt G, Ekvall H, Gisslen M, Sönnernborg A, et al. Low prevalence of transmitted drug resistance in patients newly diagnosed with HIV-1 infection in Sweden 2003-2010. *PLoS One* 2012; 7(3):e33484.
114. Vercauteren J, Wensing AM, van de Vijver DA, Albert J, Balotta C, Hamouda O, et al. Transmission of drug-resistant HIV-1 is stabilizing in Europe. *J Infect Dis*. 2009; 200(10):1503-8.
115. Schmidt D, Kollan C, Fätkenheuer G, Schülter E, Stellbrink HJ, Noah C, et al. Estimating trends in the proportion of transmitted and acquired HIV drug resistance in a long term observational cohort in Germany. *PLoS One* 2014; 9(8):e104474.

116. de Mendoza, C., Rodríguez, C., Colomina, J., Tuset, C., García, F., Eirós, J.M., et al. Resistance to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors and prevalence of HIV type 1 non-B subtypes are increasing among persons with recent infection in Spain. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 41:1350–1354.
117. Monge S, Díez M, Alvarez M, Guillot V, Iribarren JA, Palacios R, et al. Use of cohort data to estimate national prevalence of transmitted drug resistance to antiretroviral drugs in Spain (2007-2012). *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21(1):105.e1
118. Romero A, Sued O, Puig T, Esteve A, Pumarola T, Casabona J, et al. Prevalence of transmitted antiretroviral resistance and distribution of HIV-1 subtypes among patients with recent infection in Catalonia (Spain) between 2003 and 2005. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 29(7):482-9.
119. Fernández-Caballero Rico JÁ, Chueca Porcuna N, Álvarez Estévez M, Mosquera Gutiérrez MD, Marcos Maeso MÁ, García F. A safe and easy method for building consensus HIV sequences from 454 massively parallel sequencing data. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016 Oct 3.
120. Liang B, Luo M, Scott-Herridge J, Semeniuk C, Mendoza M, Capina R, et al. A comparison of parallel pyrosequencing and Sanger clone-based sequencing and its impact on the characterization of the genetic diversity of HIV-1. *PLoS One.* 2011; 6:e26745.
121. Zhang M, Foley B, Schultz AK, Macke JP, Bulla I, Stanke M, et al. The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic. *Retrovirology.* 2010;7:25.
122. Beerenwinkel N, Däumer M, Oette M, Korn K, Hoffmann D, Kaiser R et al. Geno2pheno: Estimating phenotypic drug resistance from HIV-1 genotypes. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:3850-5.
123. de Oliveira T, Deforche K, Cassol S, Salminen M, Paraskevis D, Seebregts C et al. An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics.* 2005;21:3797-800.
124. Alcantara LC, Cassol S, Libin P, Deforche K, Pybus OG, Van Ranst M et al. A standardized framework for accurate, high-throughput genotyping of recombinant and non-recombinant viral sequences. *Nucleic Acids Res.* 2009 J;37(Web Server issue):W634-42.
125. Sacktor N, Nakasujja N, Skolasky RL, Rezapour M, Robertson K, Musisi S et al. HIV subtype D is associated with dementia, compared with subtype A, in

immunosuppressed individuals at risk of cognitive impairment in Kampala, Uganda. *Clin Infect Dis.* 2009;49:780-6.

126. Galán JC, Aguilera A, González-Alba JM, Rodríguez-Calviño JJ, Moldes Suárez LM, Pérez-Elías MJ et al. Can the rapid subtyping tools identify the increasing new HIV-recombinant forms? 2009. In: 7th European HIV Drug Resistance Workshop, Stockholm, Sweden.

127. Switzer W, Saduvala N, Zhang T, Hernandez AL, Libin P, Struck D et al. Comparing Three HIV-1 Subtyping Tools and a Novel Phylogenetic-Based Method. En: Posters electrónicos CROI 2016, Abstract Number 211. Boston, Massachusetts (EEUU): IAS-USA; 2016 [acceso 9 de enero de 2016]. <http://www.croiconference.org/abstracts/search-abstracts/>

128. Fernández-García A, Delgado E, Montero V, López-Soria L, Cisterna R, Elorduy L et al. Identificación de una nueva forma recombinante circulante del VIH-1 (CRF89_BF) que se propaga en Bolivia, Argentina y España. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016; 34 (Especial Congreso 3): 77-78.

129. McCutchan FE. Global epidemiology of HIV. *J Med Virol.* 2006;78 Suppl 1:S7-S12.

130. Konings FA, Burda ST, Urbanski MM, Zhong P, Nadas A, Nyambi PN. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) circulating recombinant form 02_AG (CRF02_AG) has a higher in vitro replicative capacity than its parental subtypes A and G. *J Med Virol.* 2006;78:523-34.

131. Njai HF, Gali Y, Vanham G, Clybergh C, Jennes W, Vidal N et al. The predominance of Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) circulating recombinant form 02 (CRF02_AG) in West Central Africa may be related to its replicative fitness. *Retrovirology.* 2006;3:40.

132. Holguín, A., de Mulder, M., Yebra, G., López, M., Soriano, V. Increase of non-B subtypes and recombinants among newly diagnosed HIV-1 native Spaniards and immigrants in Spain. *Curr. HIV Res.* 2008; 6:327–334.

133. Aggarwal, I., Smith, M., Tatt, I.D., Murad, S., Osner, N., Geretti, A.M., et al. Evidence for onward transmission of HIV-1 non-B subtype strains in the United Kingdom. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2006; 41:201–209.

134. Pillonel, J., Barin, F., Laperche, S., Bernillon, P., Le Vu, S., Brunet, S., et al. Transfusion-Transmissible Agents Working Group of the French Society of Blood Transfusion. Human immunodeficiency virus type 1 incidence among blood donors in

- France, 1992 through 2006: use of an immunoassay to identify recent infections. *Transfusion*. 2008; 48:1567–1575.
135. Holguín, A., López, M., Soriano, V. Reliability of rapid subtyping tools compared to that of phylogenetic analysis for characterization of human immunodeficiency virus type 1 non-B subtypes and recombinant forms. *J. Clin Microbiol*. 2008; 46:3896–3899.
136. Lai A, Riva C, Marconi A, Balestrieri M, Razzolini F, Meini G, et al. Changing patterns in HIV-1 non-B clade prevalence and diversity in Italy over three decades. *HIV Med*. 2010; 11(9):593-602.
137. Vercauteren J, Wensing A, Van de Vijver D, Albert J, Balotta C, Hamouda O, et al. Transmission of drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 is stabilizing in Europe. *J Infect Dis*. 2009; 200:1503–8.
138. Bartmeyer B, Kuecherer C, Houareau C, Werning J, Keeren K, Somogyi S, et al. Prevalence of transmitted drug resistance and impact of transmitted resistance on treatment success in the German HIV-1 Seroconverter Cohort. *PLoS One*. 2010; 5:e12718.
139. Hillis DM, Bull JJ. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analyses. *Syst Biol*. 1993; 42:182–92.
140. Pérez-Parra S, Chueca N, Álvarez M, Pasquau J, Omar M, Collado A et al. Phylodynamic and Phylogeographic Profiles of Subtype B HIV-1 Epidemics in South Spain. *PLoS One*. 2016;11(12).
141. Hoenigl M, Chaillon A, Kessler HH, Haas B, Stelzl E, Weninger K, et al. Characterization of HIV Transmission in South-East Austria. *PLoS One*. 2016; 11(3):e0151478.
142. Brenner, B.G., Roger, M., Stephens, D., Moisi, D., Hardy, I., Weinberg, J., et al. Transmission clustering drives the onward spread of the HIV epidemic among men who have sex with men in Quebec. *J. Infect. Dis*. 2011; 204:1115–1119.
143. Callegaro, A., Svicher, V., Alteri, C., Lo Presti, A., Valenti, D., Goglio, A., et al. Epidemiological network analysis in HIV-1 B infected patients diagnosed in Italy between 2000 and 2008. *Infect. Genet. Evol*. 2011; 11:624–632.
144. Fisher, M., Pao, D., Brown, A.E., Sudarshi, D., Gill, O.N., Cane, P., et al. Determinants of HIV-1 transmission in men who have sex with men: a combined clinical, epidemiological and phylogenetic approach. *AIDS*. 2010; 24:1739–1747.

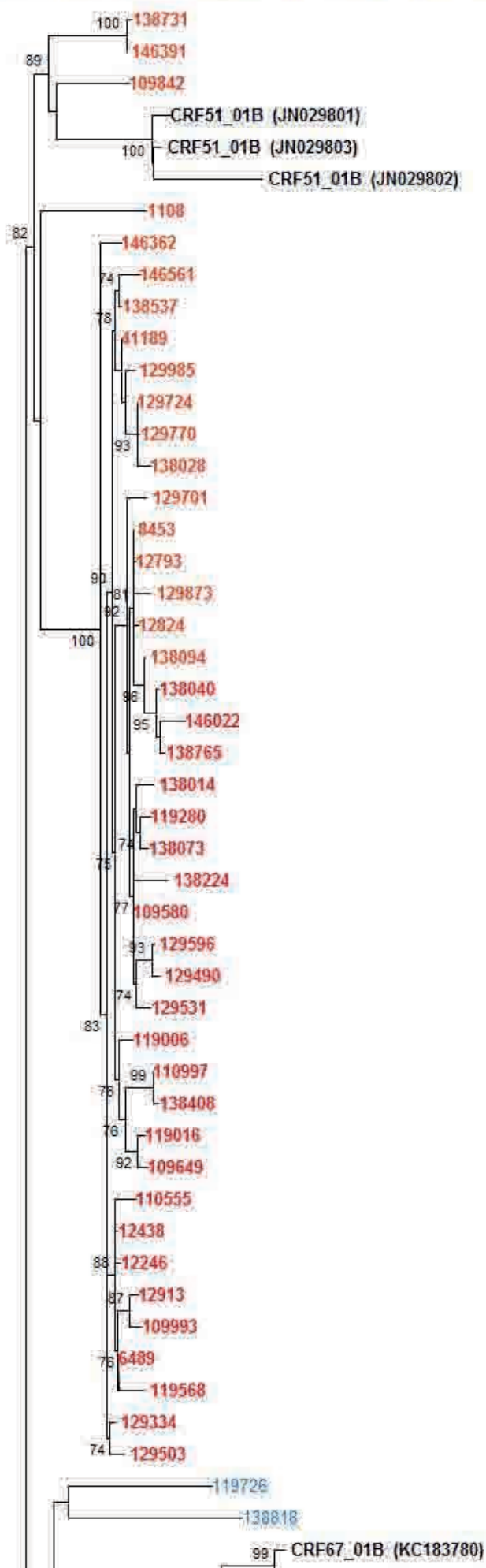
145. Kouyos, R.D., von Wyl, V., Yerly, S., Böni, J., Taffe, P., Shah, C., et al. Molecular epidemiology reveals long-term changes in HIV type 1 subtype B transmission in Switzerland. *J. Infect. Dis.* 2010; 201:1488–1497.
146. Leigh Brown AJ, Lycett SJ, Weinert L, Hughes GJ, Fearnhill E, Dunn DT, et al., UK HIV Drug Resistance Collaboration. Transmission network parameters estimated from HIV sequences for a nationwide epidemic. *J Infect Dis.* 2011; 204:1463–9.
147. Ragonnet-Cronin M, Lycett SJ, Hodcroft EB, Hué S, Fearnhill E, Brown AE, et al; United Kingdom HIV Drug Resistance Database. Transmission of Non-B HIV Subtypes in the United Kingdom Is Increasingly Driven by Large Non-Heterosexual Transmission Clusters. *J Infect Dis.* 2016; 213(9):1410-8.
148. Delgado E, Cuevas MT, Domínguez F, Vega Y, Cabello M, Fernández-García A, et al. Phylogeny and Phylogeography of a Recent HIV-1 Subtype F Outbreak among Men Who Have Sex with Men in Spain Deriving from a Cluster with a Wide Geographic Circulation in Western Europe. *PLoS One.* 2015; 10(11):e0143325.
149. Ambrosioni J, Junier T, Delhumeau C, Calmy A, Hirschel B, Zdobnov E, et al. Impact of highly active antiretroviral therapy on the molecular epidemiology of newly diagnosed HIV infections. *AIDS.* 2012; 26(16):2079-86.
150. Sukhanova AL, Bogoslovskaja EV, Kruglova AI, Bashkirova LI, Tsyganova GM, Shipulin GA et al. Protease and reverse transcriptase genetic polymorphism in HIV type 1 subtype A variants predominating in cis countries. *Mol Biol (Mosk).* 2005;39:1063-71.

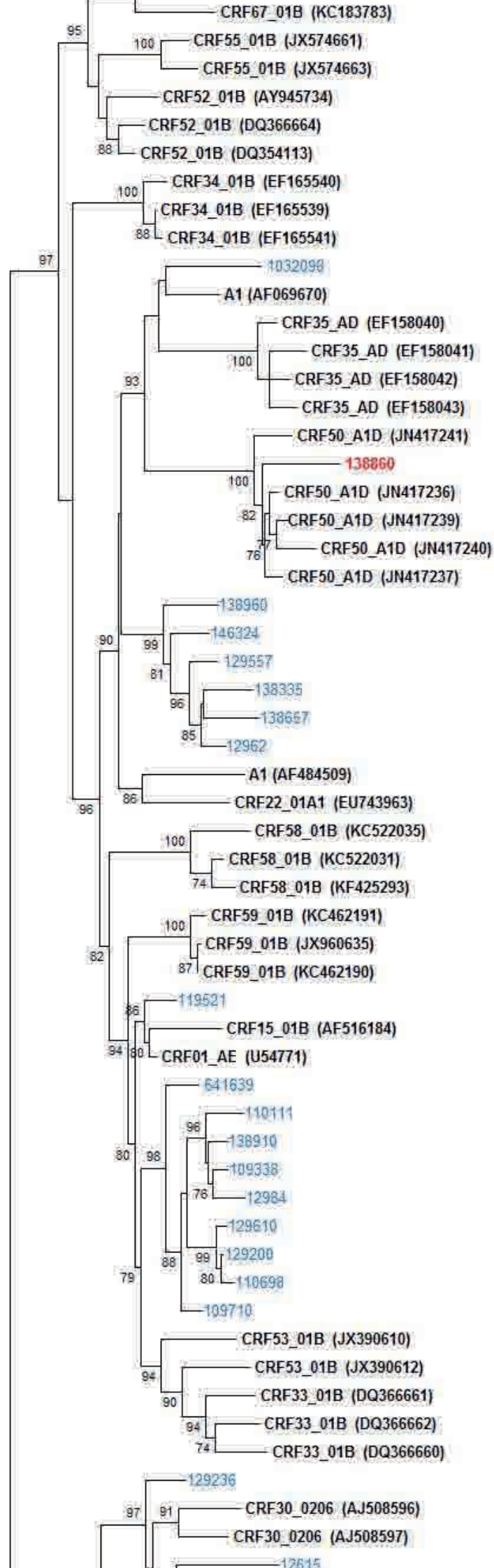
9. ANEXO

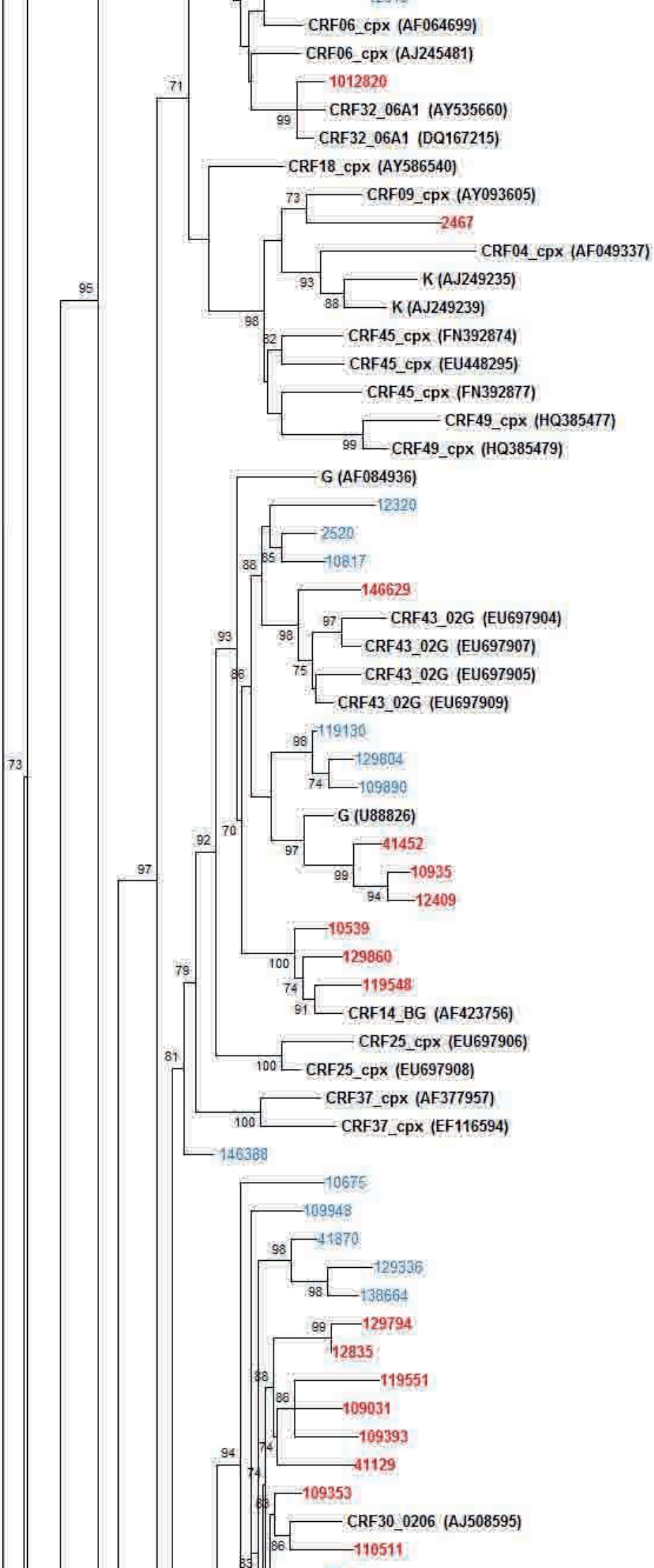


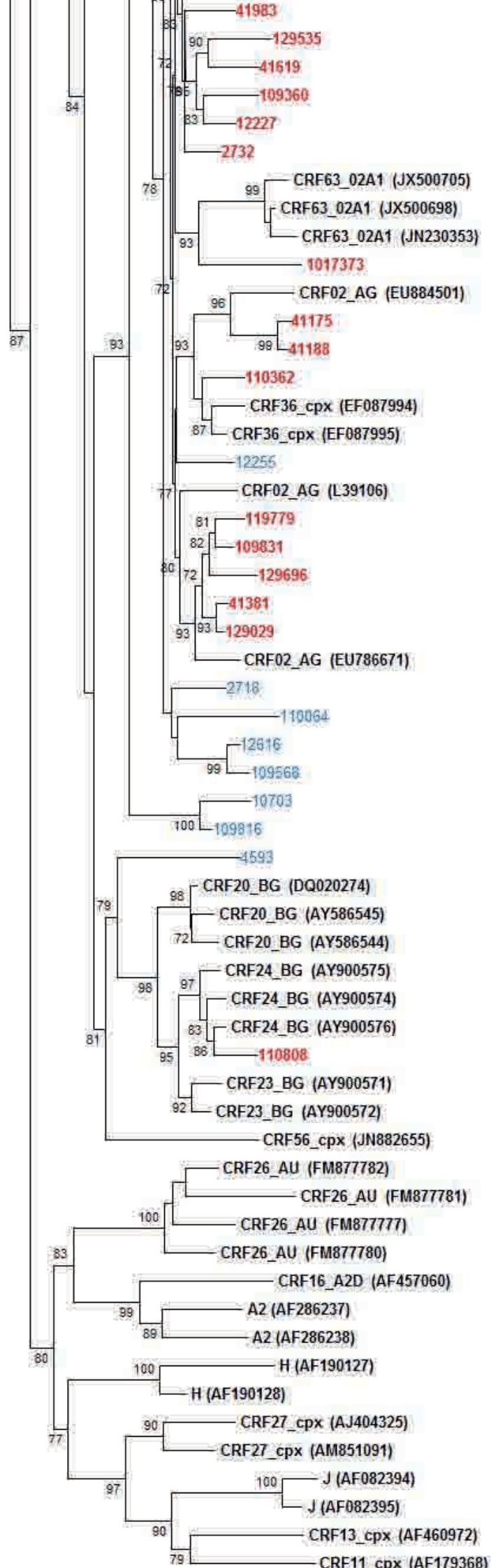
UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

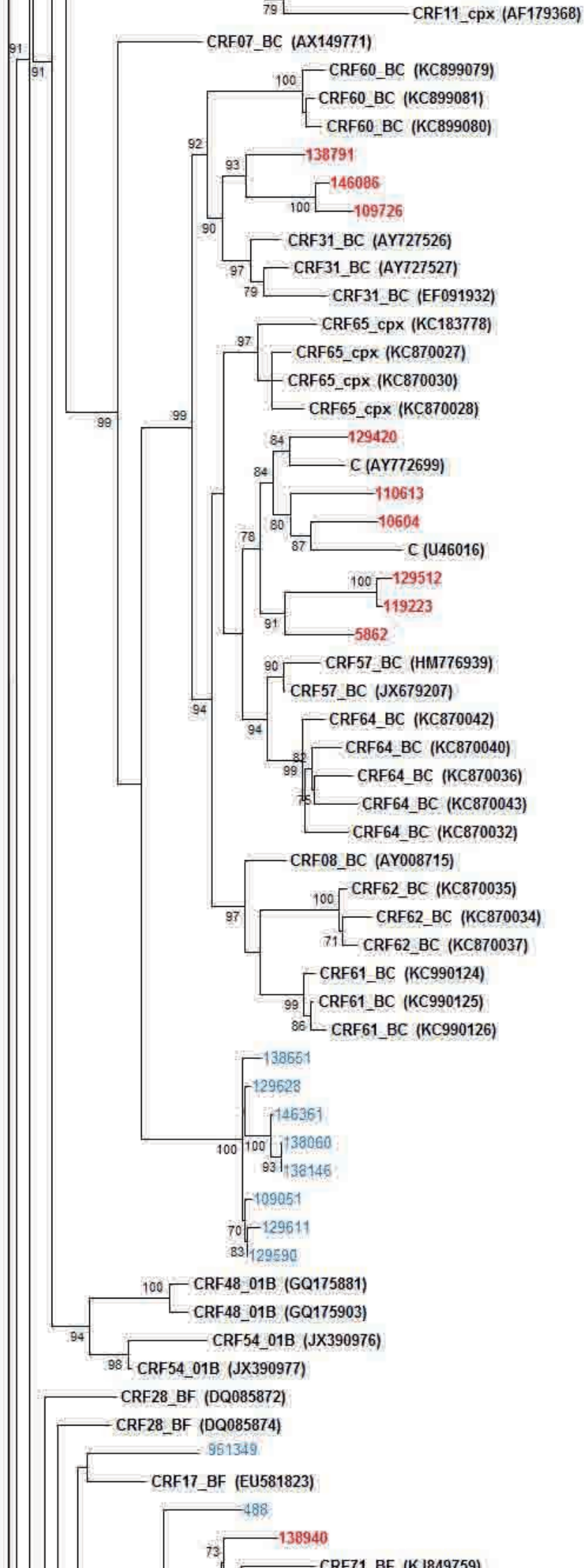
Figura 1. Reconstrucción filogenética realizada por el método de Máxima verosimilitud para la determinación del subtipo. Las agrupaciones que presentaron valores de *bootstrap* (bts) superiores al 70% son mostradas con su cifra de remuestreo correspondiente. Cada paciente es representado por el identificador de su muestra. En rojo: secuencias asociadas filogenéticamente a algún subtipo puro o CRF conocidos con un bts $\geq 70\%$. En azul: secuencias que no pudieron ser asignadas filogenéticamente con ese criterio. Las secuencias de referencia se indican en negro con su número de acceso en GenBank entre paréntesis.

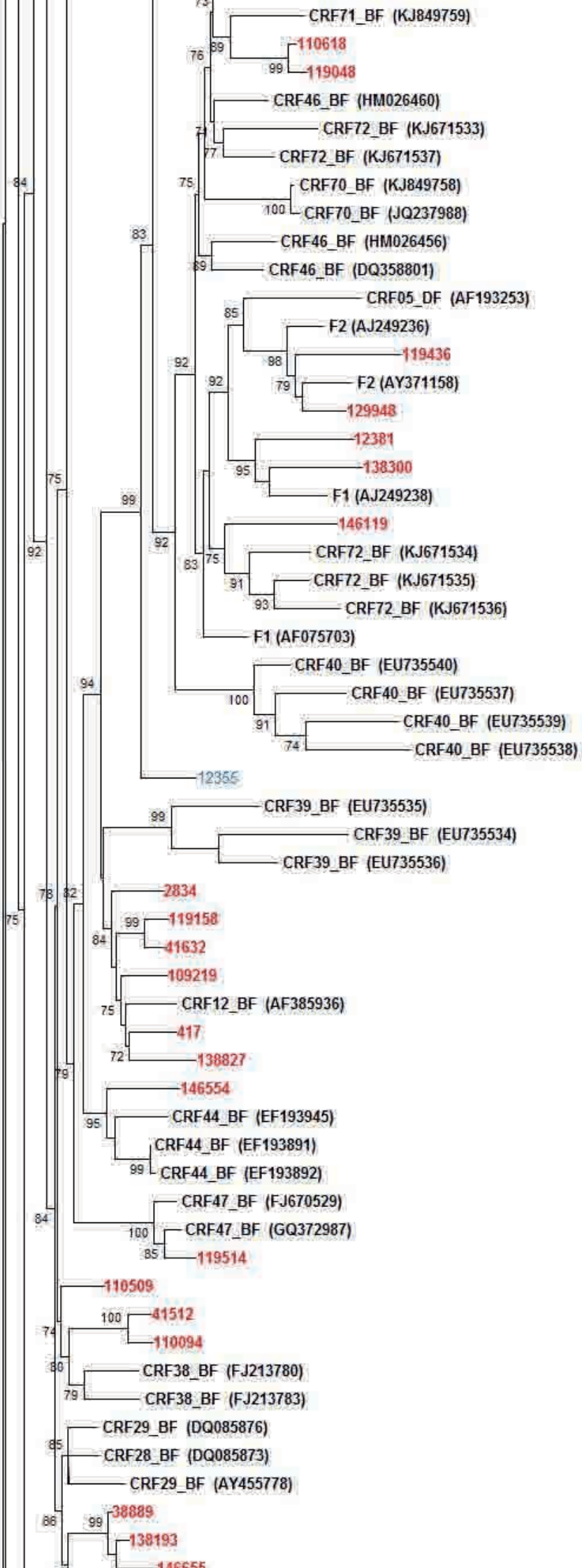


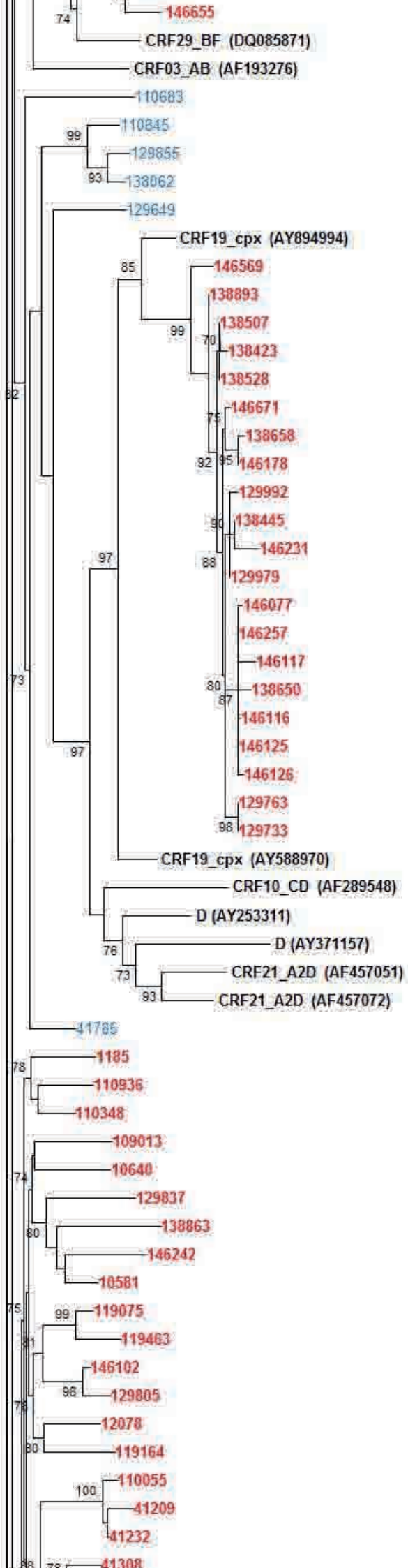


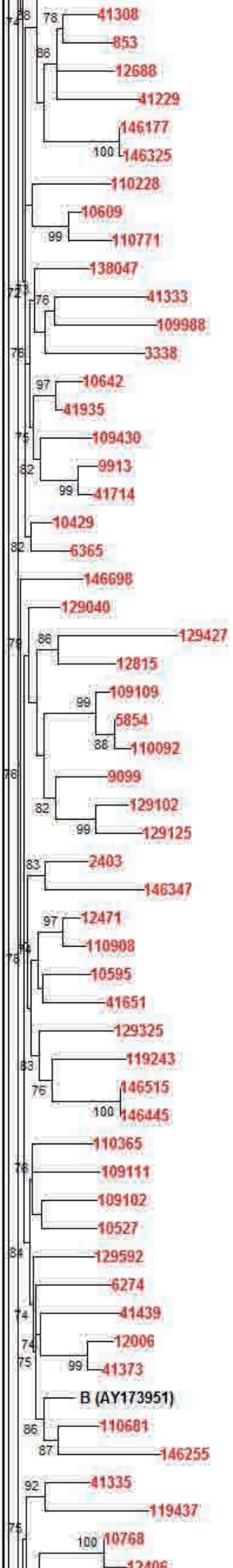


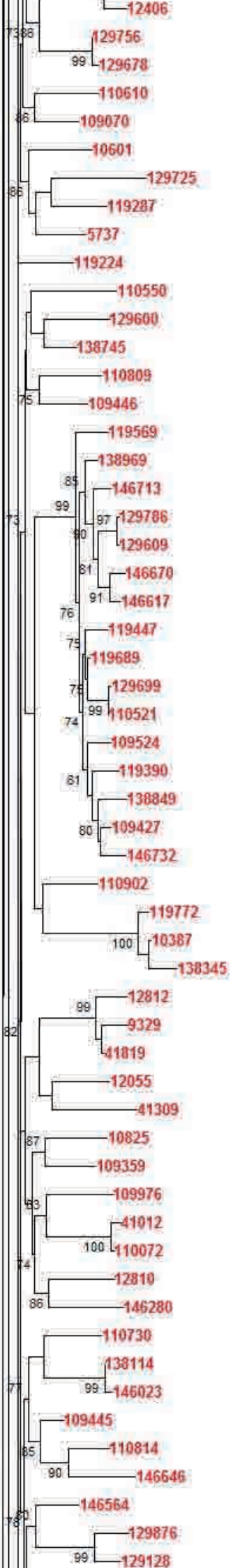


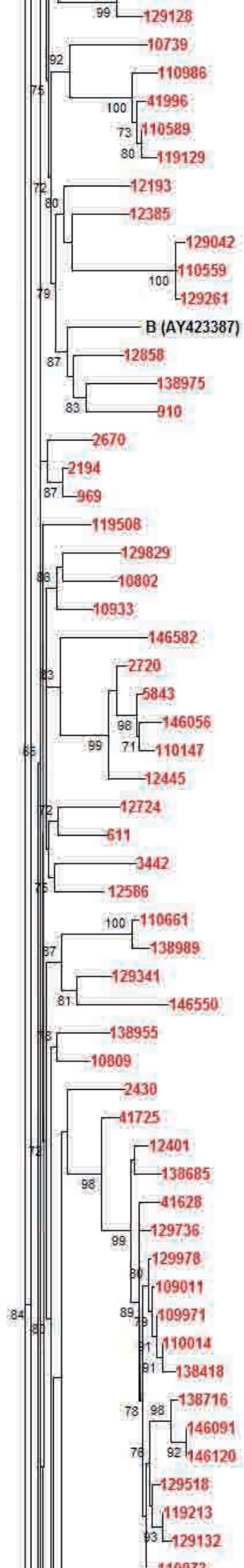


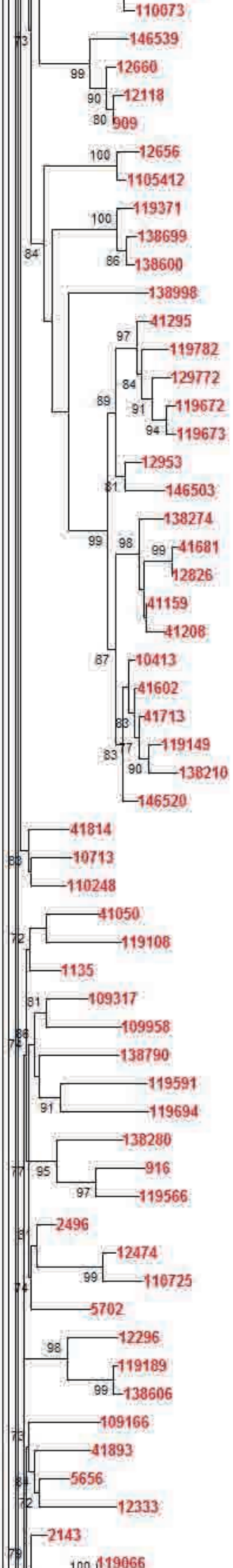


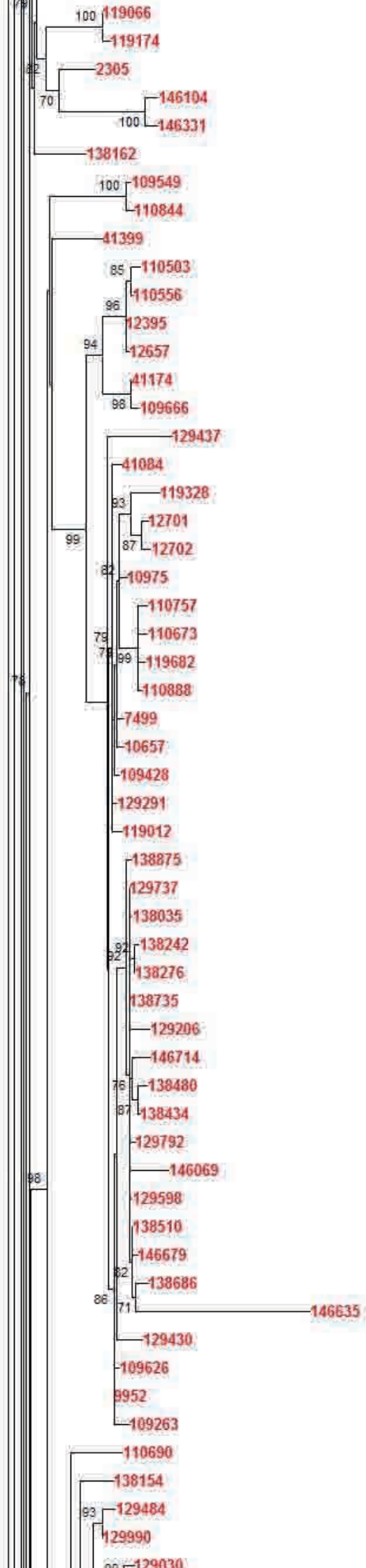


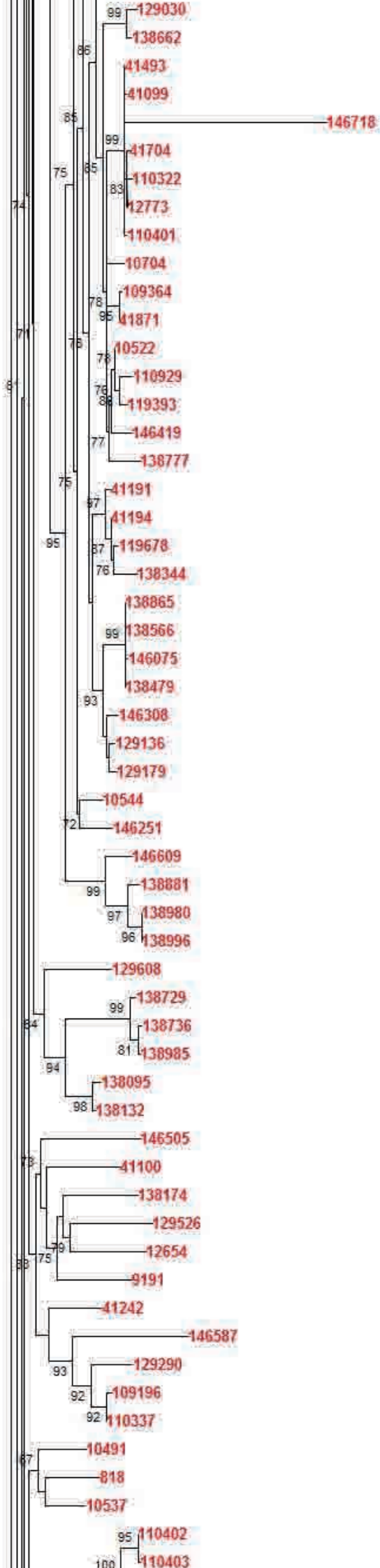


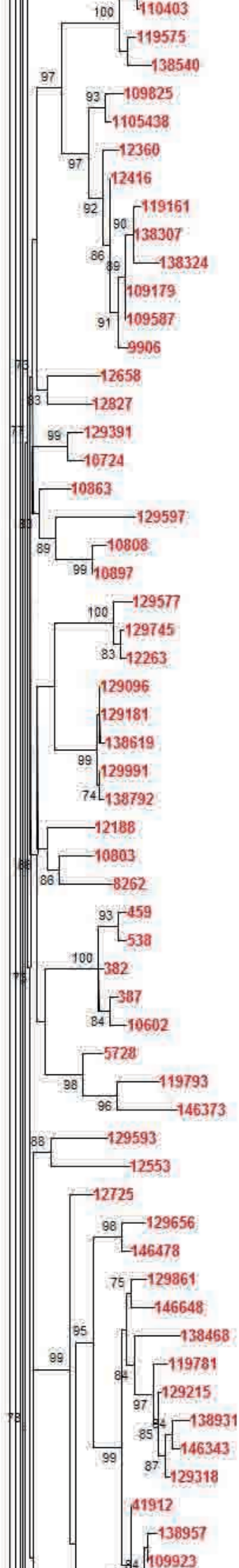


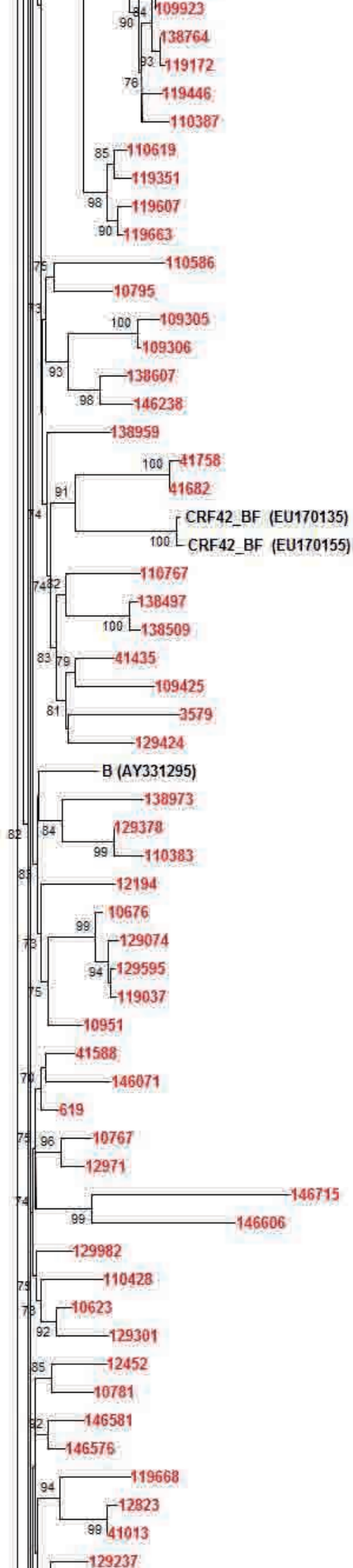


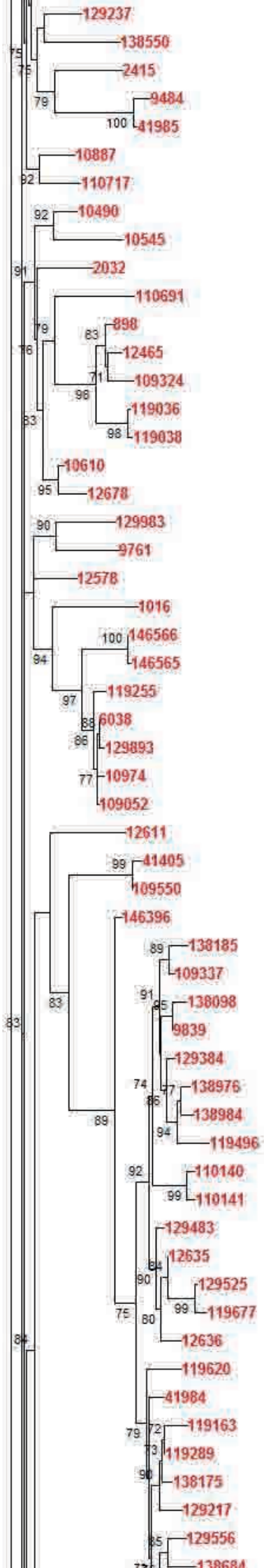


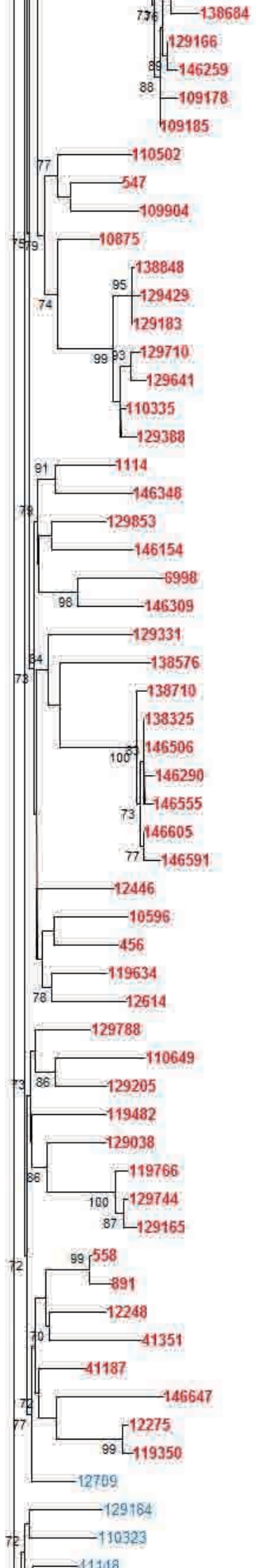


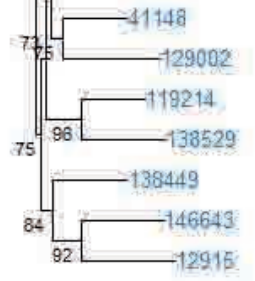






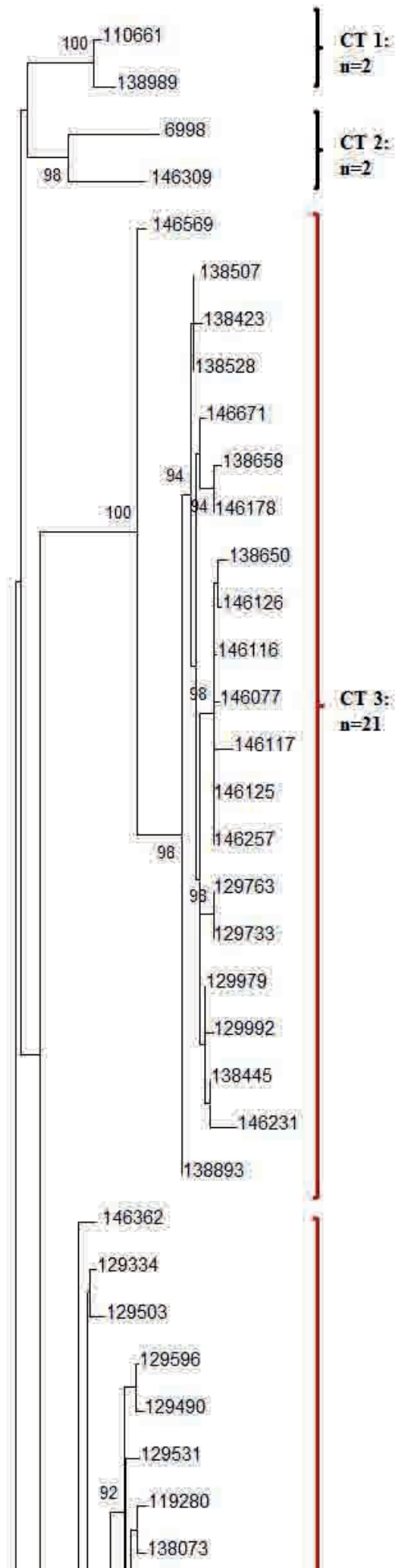


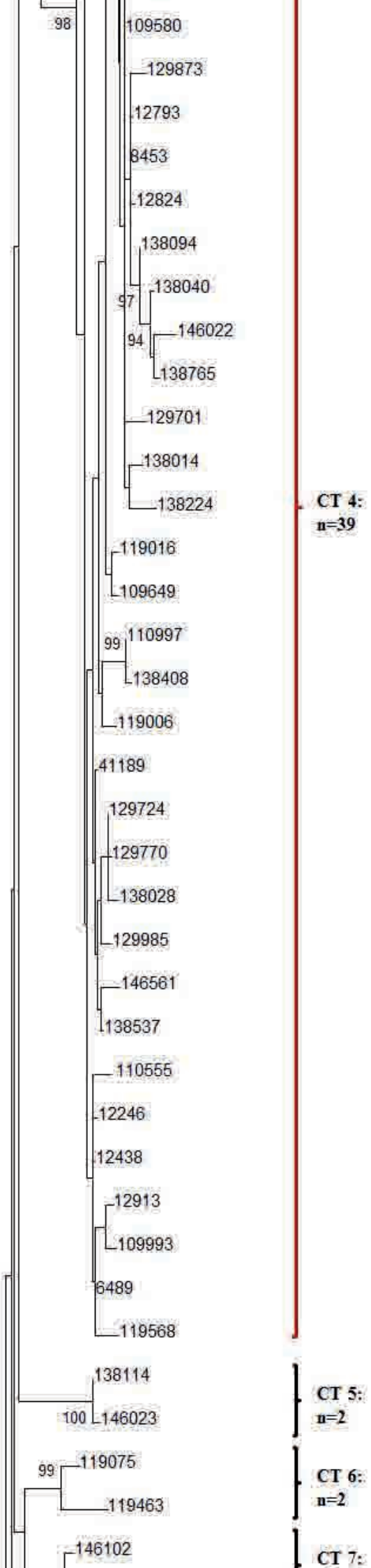


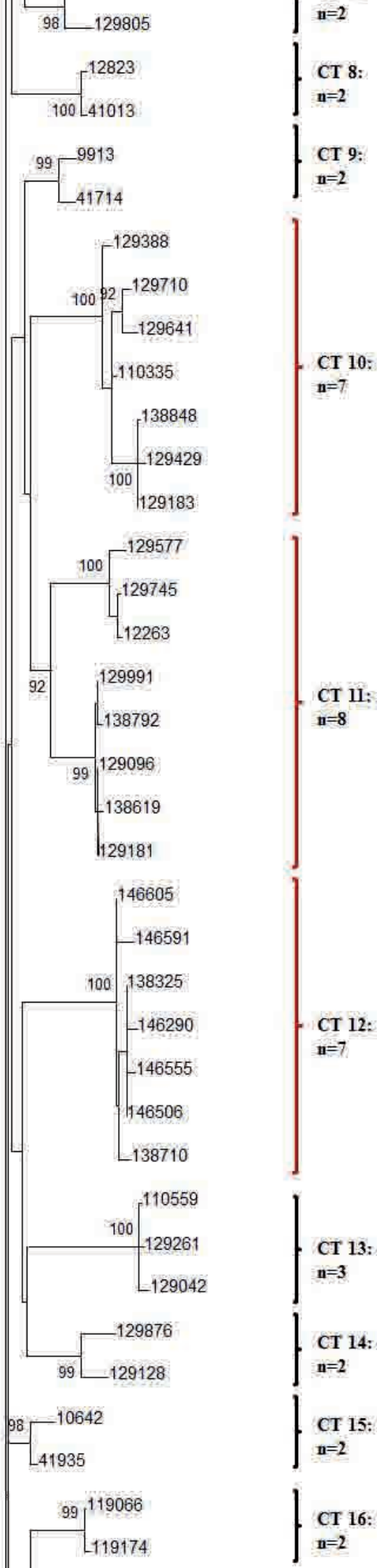


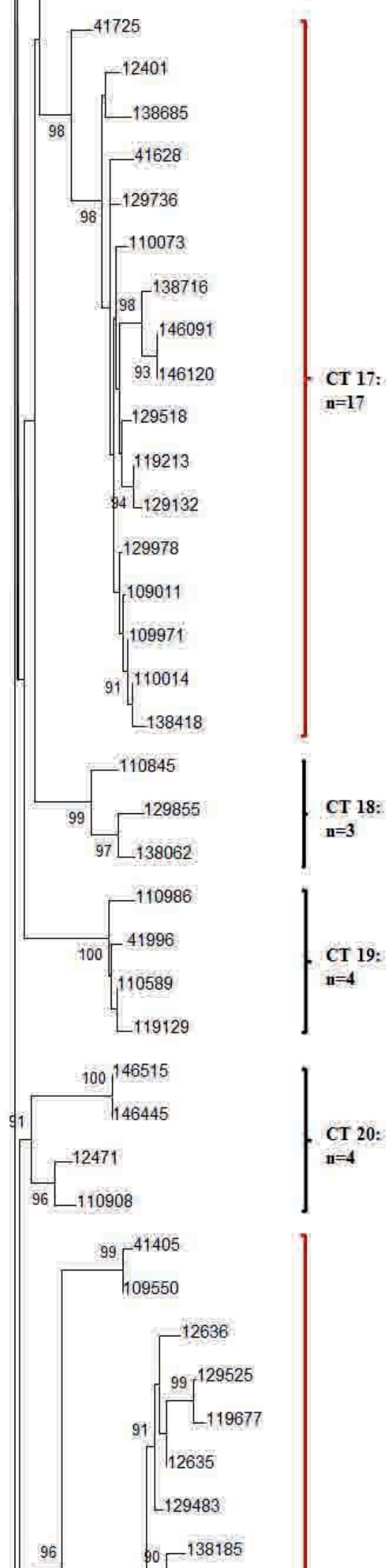
0.01

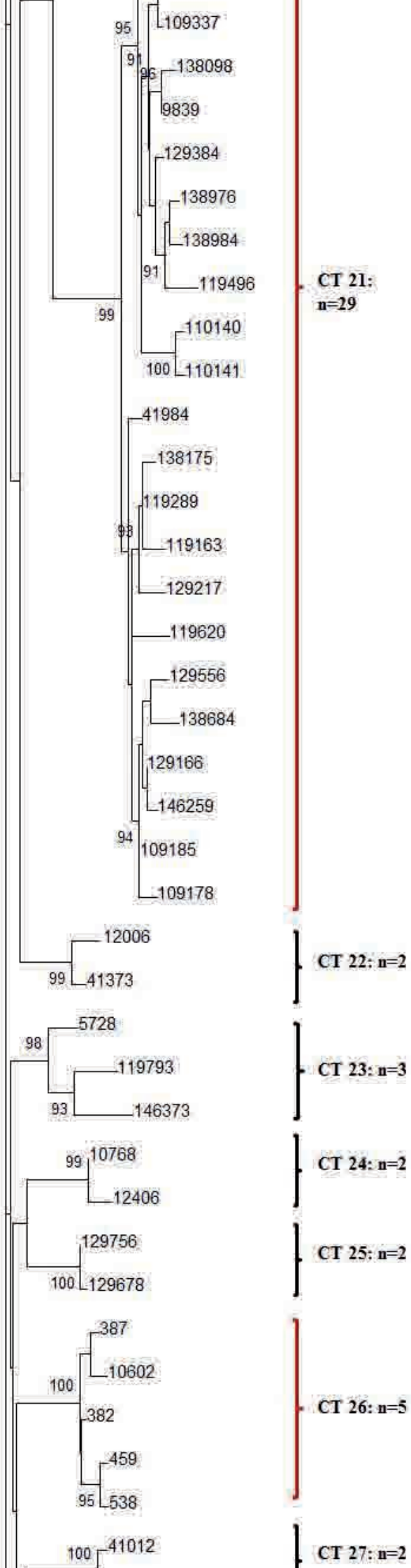
Figura 2. Reconstrucción filogenética realizada por el método de Máxima verosimilitud para el análisis de las cadenas de transmisión. Las agrupaciones que presentaron valores de *bootstrap* superiores al 90% son mostradas con su cifra de remuestreo correspondiente. Cada paciente es representado por el identificador de su muestra. En rojo se muestran las cadenas de transmisión comentadas en el estudio.

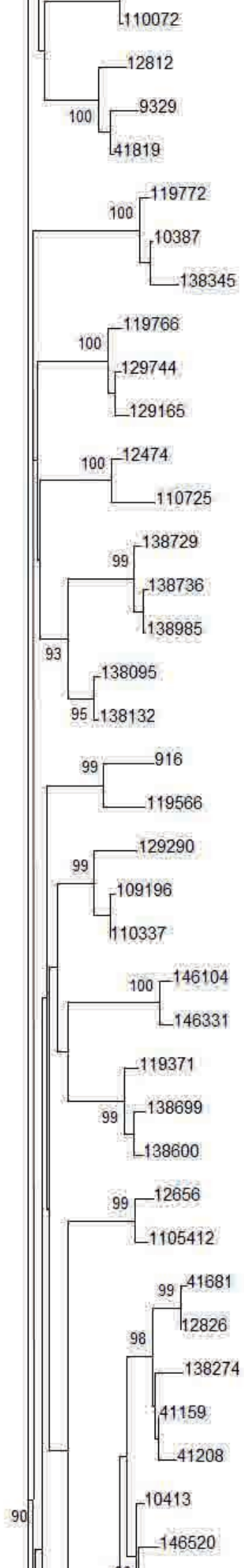




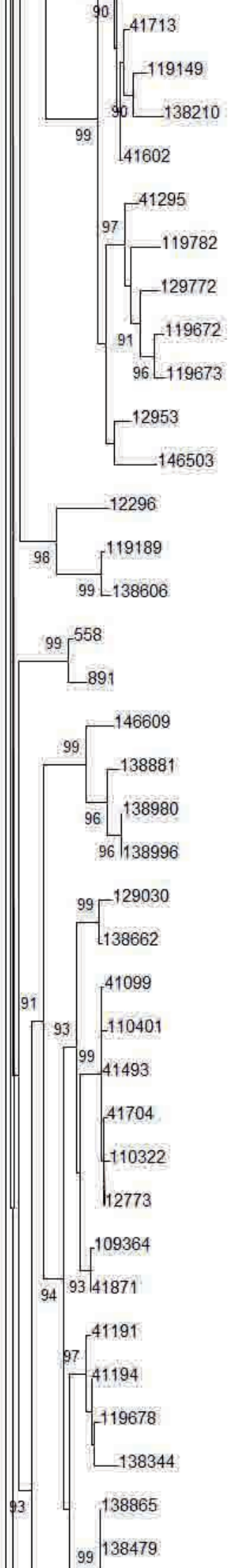




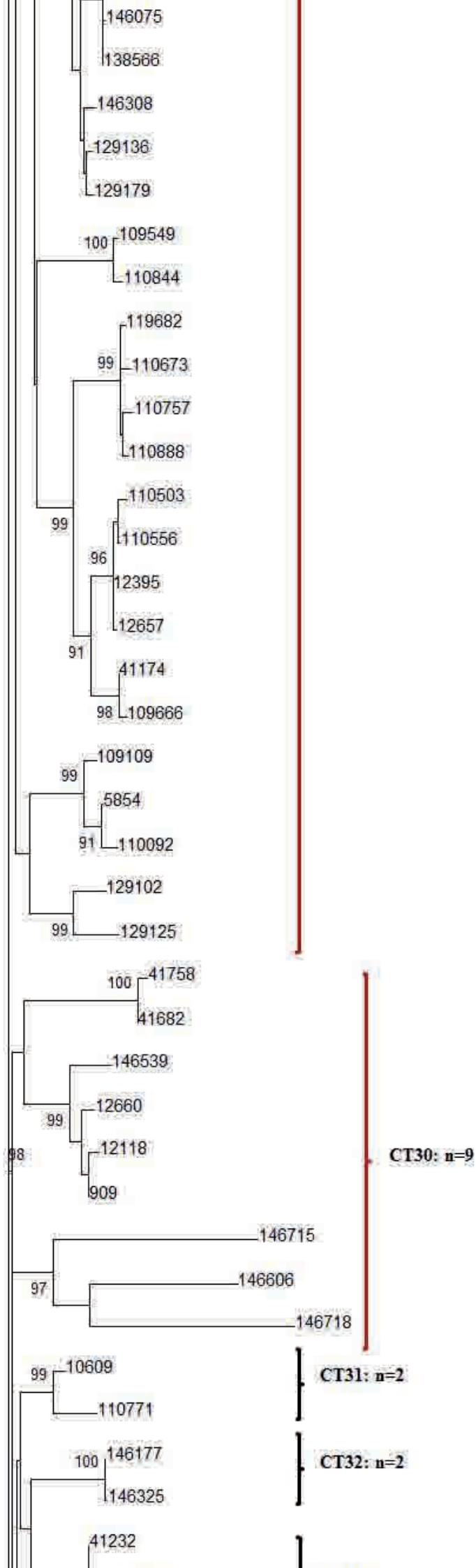


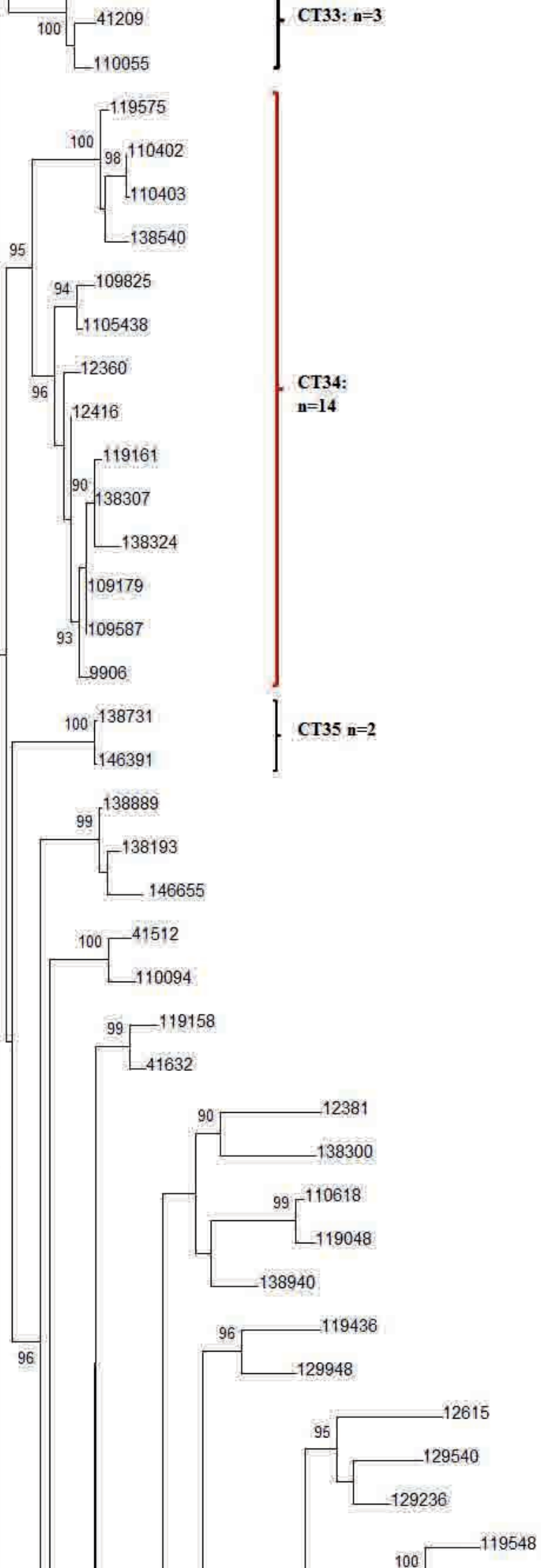


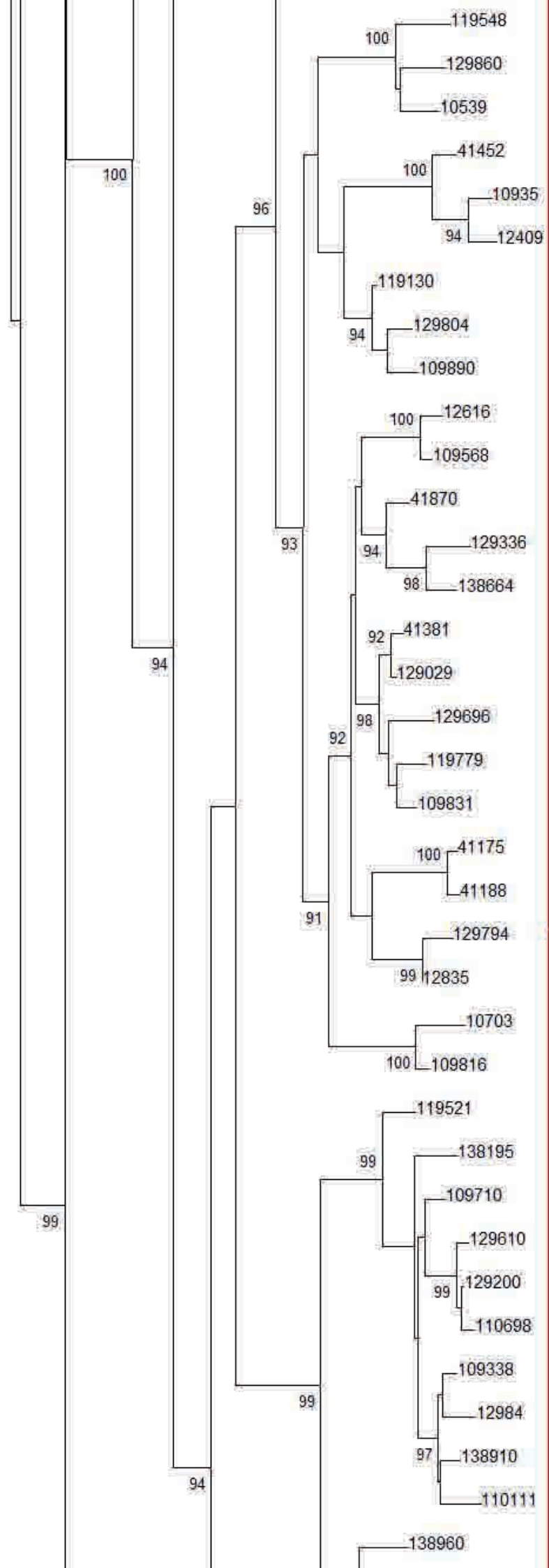
CT 28: n=3



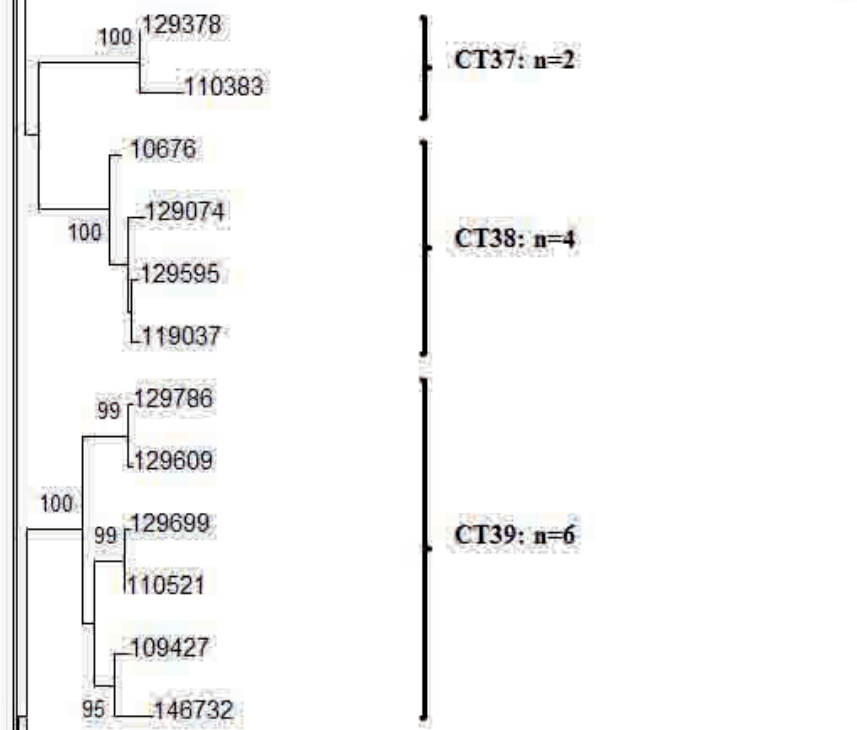
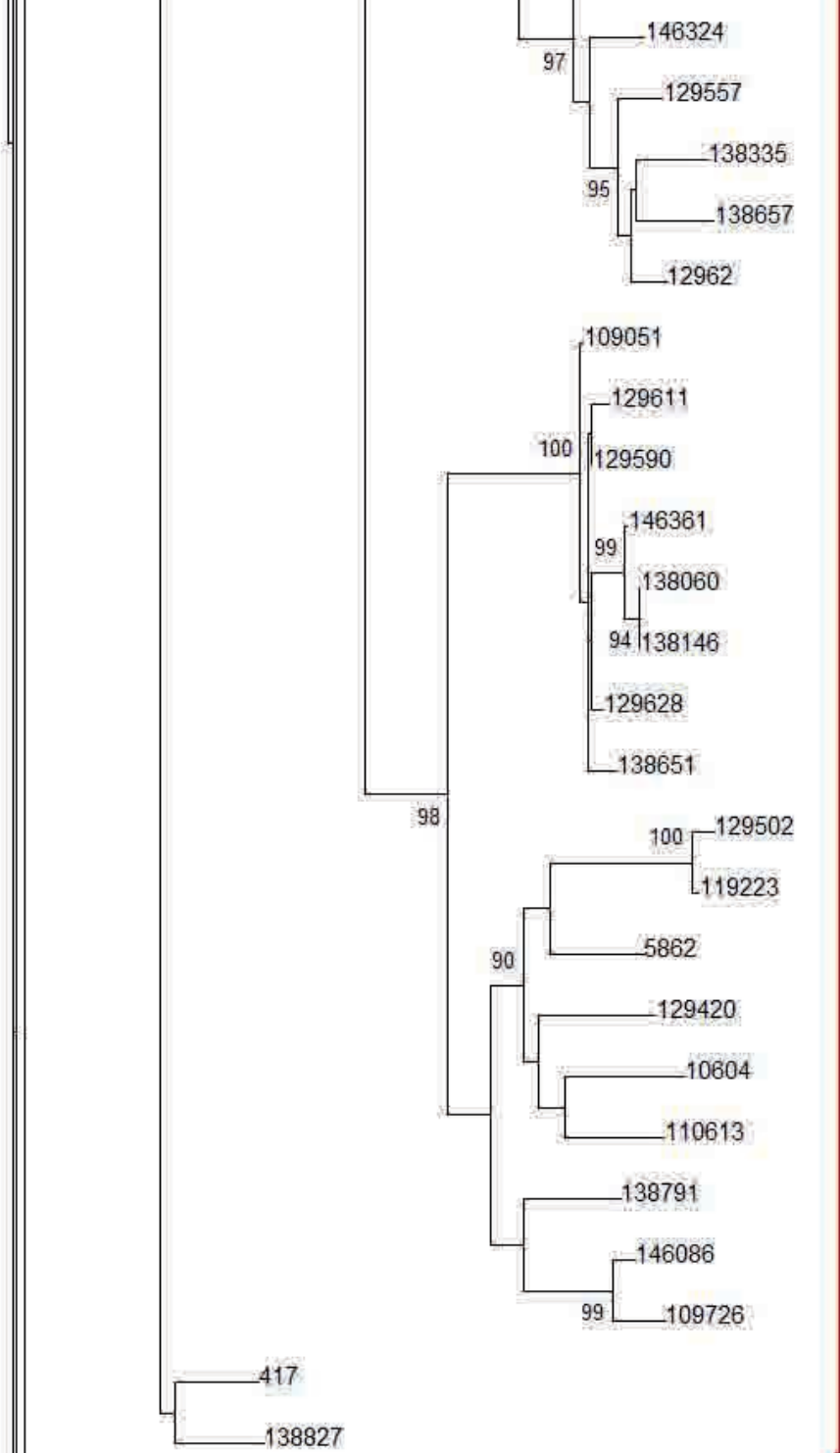
CT 29:
n=90

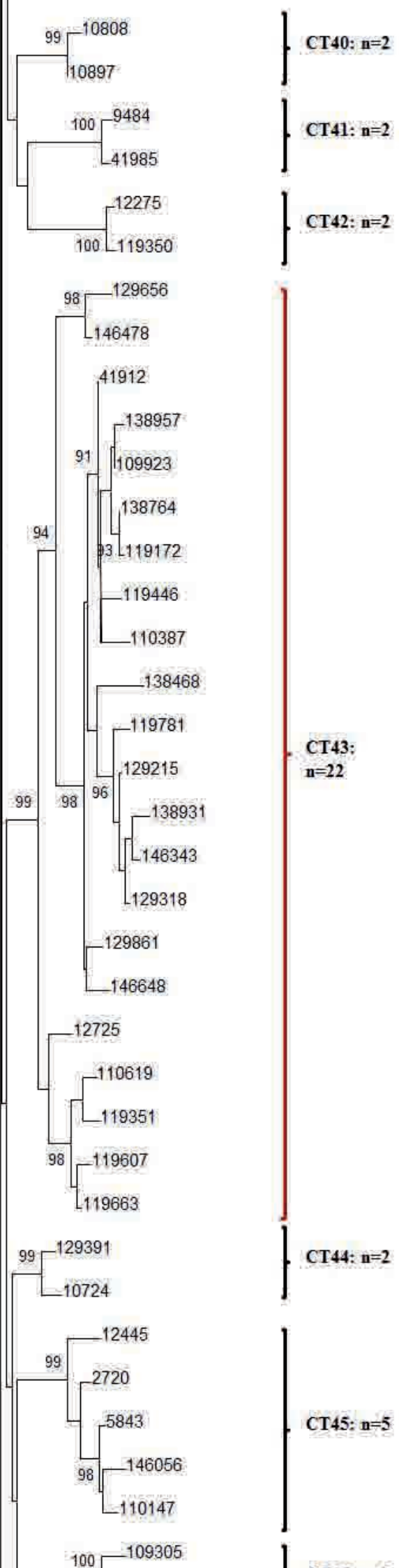


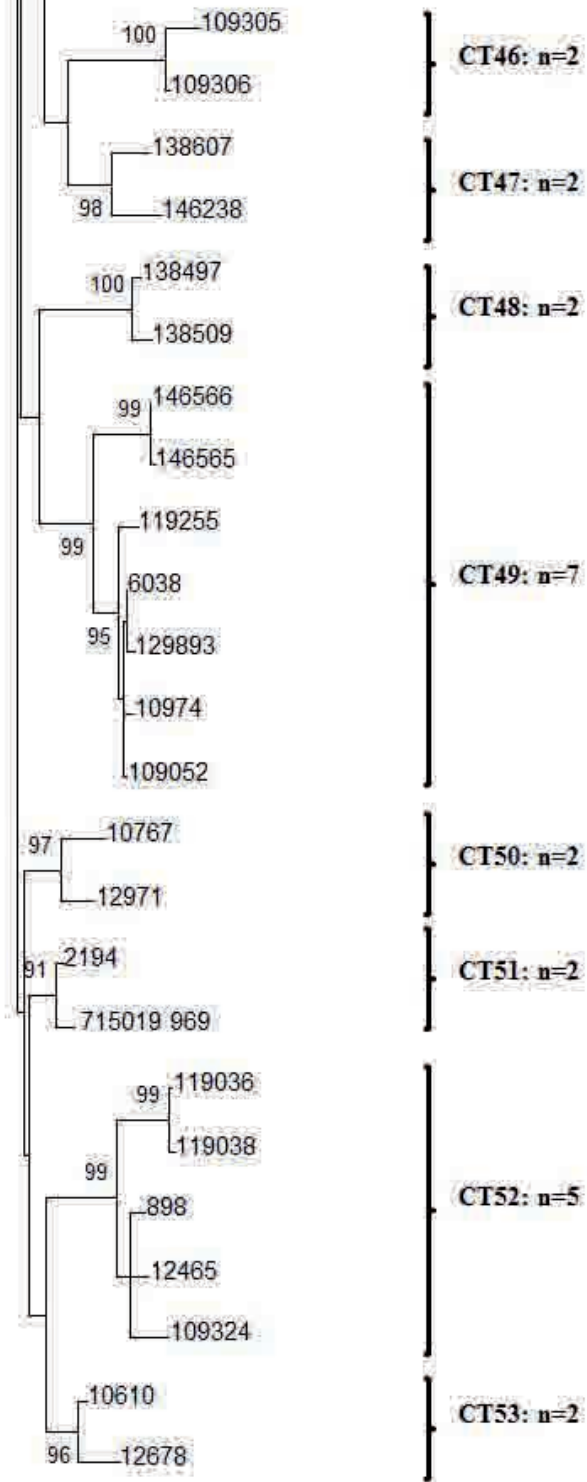




CI36:
n=77







0.02



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Las Guías de Práctica Clínica recomiendan la realización de un test genotípico de resistencia en todos los pacientes diagnosticados de infección por el VIH-1. Conocer las resistencias primarias y su evolución tiene enorme trascendencia clínica.

Disponer de la secuencia de la retrotranscriptasa y de la proteasa en estos pacientes nos abre la posibilidad de profundizar en la epidemiología molecular de la infección por el VIH-1 en el área geográfica correspondiente, mediante la realización de estudios filogenéticos.

En la práctica clínica habitual se usan herramientas de subtipado automáticas, que presentan limitaciones para la correcta clasificación de algunos subtipos no-B, especialmente de las formas recombinantes circulantes.

Los estudios filogenéticos son esenciales para conocer las cadenas de transmisión y caracterizar los brotes. La filogenia además ha demostrado ser una herramienta muy útil para describir y clasificar la variabilidad del VIH-1, convirtiéndose en el método gold estándar para la subtipificación.

