

**Universidad de Granada**



**Tesis doctoral**

**Estudio de la transmisión de resistencias primarias y de subtipos no B  
en la cohorte de pacientes VIH *naïve* de la Red de Investigación de  
SIDA (CoRIS)**

Director de Tesis

Dr. Federico García García

Doctorando

Vicente Guillot Suay

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Vicente Guillot Suay  
D.L.: GR 2146-2014  
ISBN: 978-84-9083-264-6



- **AGRADECIMIENTOS**

A Eva, por llenar mi vida.

A mis padres y mis hermanas por ser como sois y hacerme como soy.

A Federico, por confiar en mí durante todos estos años.

A Marta, Natalia, Alejandro y al personal técnico de investigación del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico San Cecilio de Granada por ser unos compañeros excepcionales y un espejo dónde mirarme.

A todos los compañeros con los que he compartido profesión, risas y lamentos durante todos estos años. Gracias de corazón por vuestra amistad.

A los miembros de la Cohorte de Investigación de la Red de SIDA (CoRIS)\*, en especial a Susana Monge y Marta Álvarez por compartir trabajo y dedicación.

\*CoRIS está financiada por la Red de Investigación en SIDA – RIS (Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en SIDA. RD06/006), por el proyecto *RD12/0017/0018* integrado en el Plan Nacional de I+D+I y cofinanciado por el ISCIII-Subdirección General de Evaluación y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

- **COMPROMISO DE RESPETO DE DERECHOS DE AUTOR**

El doctorando Vicente Guillot Suay y el director de la tesis Federico García García. Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada a 10 de Mayo de 2014

Director/es de la Tesis

Doctorando

Federico García García

Vicente Guillot Suay

Fdo.:

Fdo.:

- **TÍTULO**

Estudio de la transmisión de resistencias primarias y de subtipos no B en la cohorte de pacientes VIH *naïve* de la Red de Investigación de SIDA

- **RESÚMEN**

El estudio de la transmisión de resistencias primarias y la distribución de los subtipos de VIH presentes en los pacientes nuevos diagnósticos sin experiencia antirretroviral es de gran importancia tanto a nivel epidemiológico como clínico en el campo de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La cohorte de pacientes *naïve* de la Red de Investigación de SIDA (CoRIS) se encarga, desde el año 2004, de la inclusión de los pacientes nuevos diagnósticos infectados por el VIH de los centros colaboradores de la cohorte. La cohorte dispone de un grupo para el estudio de la prevalencia de resistencias primarias y de subtipos VIH, que se oferta a aquellos grupos que quieran participar.

En este estudio se incluyó a los pacientes *naïve* de los que se dispusiera de un estudio de resistencias de la región de la transcriptasa reversa (RT) y de la proteasa (PR) con una calidad media y/o alta. Las secuencias fasta recopiladas desde el centro coordinador de la cohorte, fueron procesadas y analizadas en el Hospital Universitario San Cecilio de Granada. Para el estudio de la influencia de las variables sociodemográficas, se recopilaron los datos de los pacientes incluidos a partir de la base de datos de CoRIS con el fin de describir la población de pacientes incluida en el estudio y de cruzarla con los datos virológicos obtenidos.

Los objetivos del estudio fueron: a) describir la prevalencia global de mutaciones de resistencias primarias a VIH-1 en la Cohorte de pacientes *naïve* de la Red de Investigación de SIDA (CoRIS), b) estudiar la tendencia de la transmisión de resistencias primarias en el periodo de estudio, c) valorar la relación existente entre las mutaciones de resistencia descritas y las variables demográficas y clínicas de la población de estudio, d) estimar la prevalencia de resistencias primarias a los antirretrovirales de primera línea recomendados en España y su influencia sobre los principales regímenes de inicio de tratamiento antirretroviral, y e) analizar la distribución de subtipos no-B, su evolución en el periodo de estudio y su relación con la transmisión de resistencias primarias.

Para describir la prevalencia de mutaciones de resistencia transmitidas (TDR), se analizaron todas las mutaciones propuestas por Bennet *et al.* en la lista de vigilancia de mutaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en las secuencias de los pacientes de CoRIS incluidos en los tres estudios presentados a lo largo de los años 2004-2011. La prevalencia global obtenida en el estudio 1, correspondiente al periodo 2004-2008, fue del 8.5% (95%CI: 6.6-10.8). Por familias de antirretrovirales (ARV), las mutaciones de resistencia a los inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de nucleósidos (ITIANs) tuvieron una prevalencia del 4.4% (95%CI: 3.0-6.1), los inhibidores de la transcriptasa reversa no análogos de nucleósidos (ITINANs) una prevalencia del 4.0% (95%CI: 2.7-5.6), y los inhibidores de la proteasa (IPs) del 2.2% (95%CI: 1.3-3.5). En el estudio 2, correspondiente a la actualización de 2007-2010, la prevalencia global de TDR se mantuvo en un 8.6% (95% IC: 7.3-9.9), siendo, para los ITIANs, del 3.9% (95%IC: 3.0-4.8), para los ITINANs de 3.9% (95%IC: 3.0-4.7) y para los IPs del 2.3% (95%IC: 1.6-3.0). En la actualización de CoRIS del año 2012, correspondiente al estudio 3 (2007-2011), la prevalencia de TDR fue del 7.9% (95%IC: 6.9-9.0), frente a ITIANs fue del 3.6% (95%IC: 2.9-4.3), a ITINANs del 3.7% (95%IC: 3.0-4.7) y a IPs del 1.7% (95%IC: 1.2-2.2).

Los resultados obtenidos indican que la prevalencia en España de TDR es baja, y similar a la de otros países europeos vecinos. Además, se observó una disminución desde el año 2007 al 2011 en la prevalencia de mutaciones presentes en los nuevos diagnósticos (8.3% 2007 vs 7.2% 2011).

No se observó ninguna influencia significativa entre las variables sociodemográficas estudiadas y la presencia de TDR, excepto en la influencia de nivel educativo. Esta relación puede deberse, principalmente a que el nivel educativo es un indicador del estatus socioeconómico de los pacientes. Este es el primer estudio en España en el que se describe este hallazgo.

Para estudiar la resistencia a antirretrovirales de primera línea recomendados en España se recodificaron las categorías de interpretación de sensibilidad informadas por el algoritmo de interpretación de resistencias de Stanford. Se analizó la interpretación de Stanford de todas las secuencias incluidas en el estudio a Abacavir (ABC), Tenofovir (TDF) como ITIANs de primera línea, Efavirenz (EFV) y Nevirapina (NVP) como ITINANs y a Darunavir (DRV), Atazanavir (ATV) y Lopinavir (LPV) como IPs de elección en inicio de régimen terapéutico en pacientes *naïve*. Además, se categorizó la potencia de los regímenes terapéuticos mediante el cálculo del GSS (Genotypic Sensibility Score) con el objetivo de mostrar el verdadero impacto de las mutaciones de resistencia presentes sobre las principales combinaciones de ARV de inicio. La prevalencia global de resistencia con relevancia clínica en CoRIS fue de 6.8% (95%IC 5.8-7.7), menor de lo que cabría esperar si nos basamos en la prevalencia de TDRs en la misma población de estudio, siendo menor que la prevalencia de TDRs en los ITIANs e IPs y mayor en los ITINANs. Por familia de ARV, la prevalencia de resistencia clínicamente relevante en los ITIAN fue de 2.3% (95%IC 1.8-2.9) [ABC: 2.2% (95%IC 1.7-2.8); TDF: 1.6% (95%IC 1.1-2.1);

FTC/3TC: 0.7% (95%IC 0.4-1.0)], a los ITINANs de 4.6%; (95%IC 3.8-5.3) [NVP: 4.6% (95%IC 3.8-5.3); EFV: 4.0% (95%IC 3.3-4.8)] y a los IPs de 0.8% (95%IC 0.4-1.1) [DRV: 0.1% (95%IC 0.0-0.3); ATZ: 0.7% (95%IC 0.4-1.0); LPV: 0.3% (95%IC 0.1-0.5)]. La principal causa de presencia de TDR sin resistencias con relevancia clínica fue debida a la presencia de mutaciones aisladas en los ITIANs e IPs. Por el contrario, la presencia de una mayor prevalencia de resistencia con relevancia clínica que de TDR en los ITINANs, fue debida a la presencia de una o la combinación de dos mutaciones no presentes en la lista de mutaciones de la OMS para el estudio de pacientes *naïve*.

Al analizar el efecto de las resistencias primarias sobre los principales regímenes terapéuticos, se observó que los más afectados fueron los que contenían un ITINAN, variando del 5.6% al 6.2% en función de los fármacos acompañantes del ITINAN. La resistencia en regímenes basados en IPs fue menos común, entre el 2.2% y 2.7%. Si tomamos en consideración el número de pacientes con un régimen terapéutico con la combinación de 2 ARV plenamente activos y 1 con resistencia intermedia (GSS=2.5), la resistencia con relevancia clínica descendió a 115 pacientes en vez de los 188 pacientes anteriormente citados.

Para el cálculo de la distribución de subtipos en la población de pacientes de CoRIS incluida en los tres estudios y del análisis filogenético se analizaron las secuencias fasta de la región de la proteasa con la herramienta de subtipado de Therapy Edge<sup>TM</sup> (ABL, Louxembourg). La prevalencia de subtipos no-B fue de 15.9% (95%IC 14.3-17.6). Sin embargo, cabe destacar que la proporción de individuos infectados con subtipos no-B se incrementó a lo largo del periodo de estudio, de 11.9% (95%IC 8.9-14.9) en 2007 a 18.1% (95%IC 14.4-21.9) en 2010 ( $p$  de tendencia = 0.018). Los subtipos no-B más prevalentes fueron CRF02\_AG (4.2%; 95%IC 3.3-5.1), subtipo F1 (1.6%; 95%IC 1.0-2.2), subtipo D (1.5%;

95%IC 0.9-2.0), subtipo G (1.1%; 95%IC 0.6-1.5), y CRF12\_BF (1.1%; 95%IC 0.6-1.5). El impacto de los subtipos no B en los nuevos diagnósticos VIH en España es importante, observándose una tendencia ascendente a lo largo del periodo de estudio. Comparándolo con la situación de otros países vecinos, la prevalencia de subtipos no B en España aún es moderada, y es debida principalmente a la población inmigrante.

- **PALABRAS CLAVE**

VIH

Resistencias primarias

Subtipos no-B

CoRIS

Recomendaciones de la OMS

Interpretación de Resistencias

## • **INDICE DE ABREVIATURAS**

3TC	Lamivudina
A	Adenina
ABC	Abacavir
ADN	Acido Desoxiribonucleico
ARN	Acido Ribonucleico
ARV	Antirretroviral
ATV	Atazanavir
AZT	Zidovudina
C	Citosina
COBI	Cobicistat
CoRIS	Cohorte Red Investigación de SIDA
CRFs	Formas Circulantes Recombinantes
CV	Carga Viral
D4T	Estavudina
ddATP	Dideoxiadenosinatrifosfato
ddCTP	Dideoxicitosinatrifosfato
ddGTP	Dideoxiguanosinatrifosfato
ddl	Didanosina
ddNTP	Didesoxinucleótidos
ddTTP	Dideoxitimidinatrifosfato
DGV	Dolutegravir
dNTP	Deoxinucleótidoatrifosfato
DRV	Darunavir
EFV	Efavirenz
ENF	Enfuvirtide
ETV	Etravirina
EVG	Elvitegravir
FOS	Fosamprenavir
FTC	Emtricitavina
G	Guanosina
GESIDA	Grupo Español de Estudio de SIDA

GSS	<i>Genotypic Sensibility Score</i>
HSH	Hombres que practican sexo con otros hombres
HTX	Heterosexuales
IC	Intervalo de confianza
IF	Inhibidor de la Fusión
InInt	Inhibidor de la Integrasa
IP	Inhibidor de la Proteasa
IQ	Rango intercuartil
ITIAN	Inihidor de la transcriptasa reversa
ITINAN	Inihidor de la transcriptasa reversa no análogo de nucleósido
LAC	Latinoamericanos y Caribeños
LPV	Lopinavir
NA	No disponible
NVP	Nevirapina
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDR	Resistencia con relevancia clínica
RAL	Raltegravir
PR	Proteasa
RPV	Rilpivirina
RT	Retrotranscriptasa
RT-PCR	<i>Retrotranscription- Polymerase Chain Reaction</i>
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
T	Timidina
TAMs	Timidine Associated Mutations
TAR	Tratamiento antirretroviral
TARGA	Tratamiento Antirretroviral de Gran Actividad
TDF	Tenofovir
TDR	<i>Transmission Drug Resistance</i>
TPV	Tipranavir
UDPV	Usuarios de drogas por vía parenteral

URFs Formas recombinantes únicas  
VIH Virus de la Inmunodeficiencia Humana

## **ABREVIATURAS AMINOÁCIDOS**

A alanina  
C cisteina  
D aspartato  
E glutamato  
F fenilalanina  
G glicina  
H histidina  
I isoleucina  
K lisina  
L leucina  
M metionina  
N asparagina  
P prolina  
Q glutamina  
R arginina  
S serina  
T treonina  
V valina  
W triptófano  
Y tirosina

• **INDICE DE CONTENIDOS**

<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes de la investigación.....	3
1.2 Justificación de la investigación.....	8
<b>Capítulo 2: Revisión de la literatura.....</b>	<b>10</b>
2.1 Resistencias primarias: concepto e implicaciones clínicas....	12
2.2 Interpretación genotípica de las resistencias a los antirretrovirales.....	17
2.3 Recomendaciones de inicio de tratamiento antirretroviral en pacientes <i>naïve</i> .....	19
2.3.1 Cuándo iniciar el TAR.....	19
2.3.2 ¿Qué combinación de antirretrovirales debe utilizarse? .....	19
2.4 Métodos de laboratorio para la detección de resistencias a antirretrovirales.....	22
2.4.1 Métodos genotípicos.....	22
2.4.2 Métodos fenotípicos.....	23
2.5 Diversidad genética del VIH.....	24
2.5.1 Tipos.....	24

2.5.2 Grupos y subtipos.....	25
2.5.3 Formas circulantes recombinantes (CRFs).....	26
2.5.4 Distribución geográfica de los subtipos del VIH.....	30
2.5.5 Implicaciones clínicas y epidemiológicas de los subtipos del VIH.....	32
<b>Capítulo 3. Objetivos.....</b>	<b>34</b>
<b>Capítulo 4: Metodología.....</b>	<b>37</b>
4.1 Material.....	39
4.1.1 Área y población de estudio.....	39
4.1.2 Datos demográficos y clínicos.....	40
4.2 Métodos analíticos.....	40
4.2.1 Determinación de la carga viral.....	40
4.2.2 Detección e interpretación de mutaciones de resistencia.....	41
4.2.3 Determinación del subtipo VIH.....	42
4.2.4 Procesamiento de datos y análisis estadístico.....	42
<b>Capítulo 5: Estudio de análisis de datos y resultados.....</b>	<b>43</b>
5.1 Introducción .....	45

5.2 Análisis y resultados en cada pregunta de investigación.....	46
--	----

**Estudio 1. *Transmission of HIV drug resistance and non-B subtype distribution in the Spanish cohort of antiretroviral treatment naïve HIV-infected individuals (CoRIS).***

5.2.1 Población de estudio.....	46
5.2.2 Estudio de la prevalencia de mutaciones de resistencia primarias en el periodo 2004-2008.....	48
5.2.3 Estudio de tendencia de la evolución de TDRs en el periodo 2004-2008.....	50
5.2.4 Distribución de subtipos no-B en el periodo 2004-2008.	50

**Estudio 2. *Analysis of transmitted drug resistance in Spain in the years 2007-2010 documents a decline in mutations to the non-nucleoside drug class.***

5.2.5 Población de estudio.....	54
5.2.6 Estudio de la prevalencia de mutaciones resistencia primarias en el periodo 2007-2010.....	57
5.2.7 Tendencia de la evolución de resistencias primarias en el periodo de estudio 2007-2010.....	59
5.2.8 Estudio de la influencia de las variables clínicas y socio-demográficas estudiadas en la presencia de mutaciones de resistencia primarias.....	60

5.2.9 Análisis de la distribución de los subtipos no-B.....	62
<b>Estudio 3. <i>Clinically relevant transmitted drug resistance to first line antiretroviral drugs and implications for recommendations.</i></b>	
5.2.10 Población de estudio y métodos.....	66
5.2.11 Estudio de la prevalencia de transmisión de resistencias primarias en la población de estudio en el periodo 2007-2011.....	69
5.2.12 Estudio de la tendencia de la transmisión de resistencias primarias en el periodo 2007-2011.....	71
5.2.13 Resistencias primarias a los antirretrovirales de primera línea en la Cohorte de pacientes <i>naïve</i> de la Red de Investigación de SIDA (CoRIS).....	72
<b>Capítulo 6. Discusión y conclusiones.....</b>	<b>75</b>
6.1 Discusión.....	77
6.2 Limitaciones.....	82
6.3 Conclusiones.....	84
<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>86</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>98</b>



## **Capítulo 1. Introducción**



## Capítulo 1. Introducción

### 1.1 Antecedentes de la investigación

La transmisión de cepas del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) con resistencia a los antirretrovirales (TDR, *Transmitted Drug Resistance*) es un tema que ha adquirido una gran relevancia en los últimos años. Desde que se publicó, con datos concluyentes, que la determinación de resistencias primarias era coste-efectiva en poblaciones en las que la prevalencia de resistencias era superior al 1% (1), las principales guías de tratamiento antirretroviral (2, 3, 4, 5) han ido incluyendo la recomendación de realizar un ensayo de resistencias a todos los pacientes nuevos diagnósticos.

Tal es la importancia que ha adquirido esta determinación que, para algunas guías de tratamiento desde 2011 (6), no se debe utilizar un primer régimen que incluya un inhibidor de la transcriptasa reversa no análogo de nucleósidos (ITINAN) si no se ha excluido previamente la presencia de resistencias primarias. De igual modo, desde este año las guías nacionales del Plan Nacional de Salud-GESIDA (7) contemplan incluso la posibilidad de volver a repetir el ensayo de resistencias a la hora de iniciar tratamiento, en aquellos pacientes en los que exista un intervalo amplio de tiempo entre el diagnóstico y el inicio del tratamiento.

La investigación de resistencias primarias en todos los nuevos diagnósticos ha permitido disponer de un gran número de series en las que se describen datos muy diversos acerca de prevalencia, incidencia y tasas de resistencias primarias. Además, el hecho de disponer de la secuencia de

la transcriptasa reversa (RT) y de la proteasa (PR) de estos pacientes ha permitido conocer la epidemiología molecular de la infección VIH, ya que estas regiones del genoma vírico son adecuadas para realizar estudios de análisis filogenético (8) para estimar el subtipo viral. Esto ha condicionado que, en un muy breve periodo de tiempo se haya podido disponer una gran cantidad de datos, aunque difíciles de comparar y, en algunas ocasiones, con escasa utilidad, ya que en la mayoría de los casos se describen poblaciones concretas, en distintos periodos de tiempo y con características demográficas muy diversas. Este hecho, junto a la diversidad de formas de análisis de las secuencias y el uso de diferentes sistemas de interpretación, y por tanto de la evaluación de las resistencias primarias, ha desembocado en una situación difícil de manejar y, sobre todo, de comparar. Estas discrepancias fueron las que llevaron, primero en 2007 (9) y finalmente en 2009 (10), a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a elaborar una serie de recomendaciones acerca de cómo estudiar y describir la prevalencia de TDR, precisamente con el objetivo de estandarizar la manera de presentar los resultados y así poderlos comparar. De forma resumida, los autores de estas recomendaciones muestran cuáles son las mutaciones que se deben investigar para caracterizar la TDR, cómo se deben interrogar las secuencias para establecer el subtipo viral, e incluyen la búsqueda de cadenas (*clusters*) de transmisión entre las cepas con TDR para, en caso de que ésta se agrupe en un brote o *cluster*, corregir la prevalencia de TDR y no sobreestimarla. A partir de entonces, se hace más fácil, y sobre todo precisa, la comparación de TDR y de los datos de epidemiología molecular entre diferentes estudios.

Hasta la fecha, han sido muchos los estudios epidemiológicos que han investigado el impacto de la transmisión de virus con resistencias a antirretrovirales (ARV) en relación a la necesidad de realizar un estudio basal de resistencias a pacientes que no han iniciado terapia antirretroviral.

La presencia de resistencias primarias es un factor determinante en la evolución del paciente que inicia tratamiento ya que está relacionada con el aumento del tiempo en que se tarda en suprimir la carga viral del paciente y con fracasos terapéuticos más tempranos.

A la hora de comparar diferentes estudios debemos tener en cuenta varios factores importantes que afectan a la interpretación de los resultados:

1. Las mutaciones de resistencia evaluadas.

La mayoría de estudios tienen en cuenta mutaciones de resistencia publicadas por el Internacional Antiviral Society-USA (IAS-USA) o por la HIV Stanford database. Sin embargo, estas guías advierten que no han sido diseñadas para el estudio de transmisión de resistencias primarias con lo que se deben emplear con cierta precaución. Desde el año 2007 existe una guía de mutaciones de resistencia diseñada para estudios epidemiológicos de transmisión de resistencias (9). Aunque se actualiza de forma periódica, el uso como referencia de las mutaciones allí descritas puede ayudar a homogeneizar resultados entre diferentes estudios. La última actualización es de 2009 (10).

2. El periodo de tiempo desde la infección.

A medida que avanza el tiempo de infección por VIH, se va produciendo la pérdida de mutaciones de resistencia transmitidas por reversión y aumento de la población de virus *wild-type*. Esto hace que nos encontremos ante diferentes poblaciones de pacientes dependiendo del estatus de la infección. Si trabajamos con un grupo de pacientes recientemente diagnosticados la pérdida de mutaciones de resistencia quedará minimizada, teniendo un

grupo homogéneo donde coexistirán pacientes primoinfectados (infección reciente) y pacientes con infección crónica en los cuales podremos estar infravalorando la presencia de mutaciones de resistencia debido a la reversión de la población vírica circulante en plasma a cepas *wild-type*. La inclusión de ambos tipos de pacientes en el estudio permitirá aumentar la población de estudio con el fin de tener una representatividad más veraz de distintos grupos de riesgo y hacer estudios más limitados geográficamente.

### 3. Homogeneidad de los grupos de riesgo.

Se ha demostrado que el predominio de ciertos grupos de riesgo en los estudios de transmisión de resistencias primarias conlleva a una sobreestimación de éstas. Por ejemplo, el grupo de riesgo de hombres que practican sexo con otros hombres (HSH) se hacen controles de VIH con mayor frecuencia que otros grupos de riesgo con lo que es más probable que sean diagnosticados cuando el curso de la infección es aún reciente. Existen diversos estudios recientes que apoyan la relación entre este grupo de riesgo y la transmisión de resistencias primarias (11, 12).

### 4. Áreas geográficas.

En pacientes infectados en áreas geográficas con acceso limitado a la terapia antirretroviral la transmisión de mutaciones de resistencia entre ellos es rara.

El aumento de la transmisión de resistencias primarias al virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH) es un hecho constatado en las áreas

donde está instaurado el tratamiento antirretroviral combinado, aunque, en los últimos años diferentes estudios han reflejado una tendencia decreciente de éstas (13). La prevalencia global de resistencias primarias se estima que está entre el 5% y el 21% dependiendo de factores como la población de estudio, la definición de resistencia, el estatus de la infección (reciente o crónica) y el año del estudio (14), mientras que en España, el porcentaje de resistencias publicado por diferentes estudios de ámbito lo sitúan entre el 7 y el 12% (13, 15, 16).

Además, se deben tener en cuenta otros factores como el aumento de los movimientos poblacionales debidos a la inmigración, viajes internacionales y contactos sexuales con individuos de otras regiones donde los subtipos no-B del VIH son endémicos.

Respecto a los subtipos no B, cabe destacar la importancia de su estudio debido a las implicaciones clínicas que tiene el aumento de otros subtipos no B en nuestro país. Además también tendría implicaciones de tipo epidemiológico, en la cuantificación del virus, en la detección del VIH por PCR, en la progresión a SIDA, en el diseño de vacunas de propiedades biológicas y en la susceptibilidad a antirretrovirales.

Varios estudios han informado de la introducción de subtipos no-B en sus respectivos países a raíz del aumento de la inmigración (17, 18, 19, 20). El estudio de la distribución de subtipos no-B asociado con factores demográficos en el curso de la infección por VIH en una región determinada puede ofrecer una valiosa información a la hora de diseñar estrategias clínicas, epidemiológicas y de prevención.

En España, los estudios de transmisión de resistencias primarias realizados hasta la fecha han sido, principalmente, de carácter regional,

quedando relegados a la descripción de resultados en áreas de influencia relativamente pequeños.

La cohorte de pacientes *naïve* de la Red de Investigación de SIDA (CoRIS) es la plataforma perfecta para analizar el estado actual de la transmisión de resistencias primarias a nivel estatal, ya que ofrece información relevante acerca del perfil epidemiológico actual de la infección por VIH (17) y es la plataforma ideal para el estudio de las TDR y la distribución de subtipos del VIH en España.

## **1.2 Justificación de la investigación**

El estudio de la transmisión de resistencias primarias a antirretrovirales y la distribución de subtipos no-B en pacientes *naïve* es un tema de gran importancia dentro del ámbito de estudio de la infección por el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH) que tiene relevancia teórica, relevancia práctica y relevancia económica.

### Relevancia teórica:

Desde que en 2006 y 2007 se incluyó la recomendación en diferentes guías terapéuticas de realizar un test de resistencias primarias antes de inicio terapéutico en pacientes VIH, el estudio de resistencias transmitidas y su implicación en la terapia de inicio, así como la distribución de subtipos no-B han sido aspectos de gran interés dentro del campo de la infección por VIH en todo el mundo.

En España se han publicado varios estudios tanto de ámbito nacional en pacientes recientemente infectados (21) como de ámbito regional (15).

Nuestro estudio adquiere una importante relevancia teórica debido a alta heterogeneidad de la población estudiada (tipo de infección VIH y amplia distribución geográfica del estudio) por lo que se convierte en un buen reflejo de la situación actual de la infección por VIH a nivel nacional.

#### Relevancia práctica:

El interés clínico de este estudio radica en la necesidad de conocer la situación actual de la transmisión de resistencias a antirretrovirales en nuestro entorno, y las implicaciones clínicas que tienen en el diseño de la terapia antirretroviral de inicio. Se ha demostrado que los pacientes con resistencias primarias que inician tratamiento tardan más tiempo en negativizar la viremia en plasma y fracasan mucho antes a los regímenes de inicio.

Además, el conocer la distribución de los subtipos no-B del VIH que circulan en nuestro país tiene una gran importancia epidemiológica, así como el estudio de resistencias primarias en estos subtipos.

#### Relevancia económica:

El coste económico del fracaso a la terapia antirretroviral es elevado (1). Por ello, la gran totalidad de las guías terapéuticas recomiendan un estudio basal de resistencias. Este estudio nos permite conocer la prevalencia de la transmisión de resistencias a antirretrovirales y su evolución en el tiempo, aspectos necesarios para comprender la evolución de la infección del VIH en España y para actualizar estrategias terapéuticas en los pacientes infectados que van a iniciar tratamiento antirretroviral.

## **Capítulo 2: Revisión de la literatura**



## Capítulo 2: Revisión de la literatura

### 2.1 Resistencias primarias: concepto e implicaciones clínicas

La terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) ha cambiado la historia natural de la infección VIH/SIDA, al retrasar la evolución de la enfermedad y mejorar la calidad de vida de los individuos infectados. Los países desarrollados han implementado este tipo de terapia masivamente en su población infectada en seguimiento, con resultados muy favorables. Uno de los principales problemas en la actualidad es el fracaso terapéutico y, dentro de éste, el aumento de resistencia a drogas antirretrovirales. Este problema se origina por la asociación de las características propias del virus (variabilidad genética, latencia y reactivación, adaptación a vías de entrada, infección de reservorios), junto a una inadecuada supresión viral (adherencia, farmacocinética) y uso de monoterapia y biterapia previos (21). La menor susceptibilidad del virus a las drogas está asociada a mutaciones en los genes que codifican, principalmente, para las enzimas transcriptasa reversa y proteasa viral. Según el momento de adquisición de la resistencia podemos clasificar las resistencias a antirretrovirales en dos tipos (22):

- Resistencia Primaria o transmitida: Virus mutantes resistentes a uno o varios fármacos detectados en pacientes que no han sido sometidos previamente a tratamiento antirretroviral.
- Resistencia Secundaria o adquirida: Virus mutantes resistentes detectados en pacientes que han tenido experiencia a tratamiento antirretroviral.

La prevalencia de resistencias primarias ha tenido un importante aumento en todo mundo desde el inicio de la terapia antirretroviral. Las tasas de resistencia primaria han llegado a ser muy altas en Estados Unidos y Europa, probablemente debido a que han tenido acceso por más tiempo a las drogas antirretrovirales (21, 23).

La transmisión de resistencias a fármacos antirretrovirales en pacientes que no han recibido nunca tratamiento es uno de los factores que limitan las opciones terapéuticas en la terapia de inicio además de reducir su eficacia (24, 25). El conocimiento de la prevalencia de estas resistencias primarias varía mucho de unos países a otros observándose, como hemos dicho anteriormente, las mayores tasas en zonas donde la terapia antirretroviral está bien establecida como Europa Occidental y América del norte (14, 26, 27, 28, 29). Pero además este porcentaje varía en función del diseño del estudio no existiendo en la actualidad criterios concretos. Entre los factores de riesgo descritos involucrados en la transmisión de virus resistentes en pacientes *naïve* cabe destacar:

- La elevada carga viral
- Enfermedades de transmisión sexual
- Factores genéticos aunque no se conoce el grado de influencia

Además de estos factores, la presencia de mutaciones a más de una clase de fármacos antirretrovirales también afecta a la transmisibilidad estando disminuida en virus con resistencias primarias a dos o tres clases de fármacos. Es importante además conocer las características de los sujetos donde la tasa de resistencias es más frecuente. Aunque existen estudios contradictorios, se sugiere que la transmisión de virus con resistencia primaria es más frecuente en la etnia caucasiana, pacientes

infectados con subtipo B y vía de transmisión homosexual (30, 31). El que estos factores se relacionen con mayor transmisión de mutaciones de resistencia pueden ser justificados si tenemos en cuenta que los países con mayor población de raza caucásica e infectados por subtipos B son los más desarrollados y, por tanto, los que tienen mayor acceso a la terapia antirretroviral y que los pacientes VIH homosexuales suelen ser los más concienciados a la hora de realizar la prueba de VIH. También podemos encontrar otros estudios que muestran resultados discrepantes, encontrando tendencias significativas en el aumento de TDRs en otros grupos diferentes a los anteriores (32) o no encontrando diferencias significativas al estudiar estas variables sociodemográficas (33). La alta tasa de variabilidad genética del VIH tiene también importantes implicaciones en patogenicidad, transmisibilidad, diagnóstico y tratamiento; con un impacto potencial en la epidemiología, terapia y prevención de la enfermedad. Por todas estas implicaciones, resulta esencial la caracterización de los subtipos genéticos del VIH-1 que circulan en cada área geográfica.

El aumento de la inmigración en los últimos años ha dado como consecuencia un aumento de infecciones mixtas y una desaparición de los límites geográficos de los distintos subtipos (34, 35, 36, 37, 38). A la hora de estudiar las resistencias primarias en España debemos tener en cuenta que ésta, por su situación estratégica entre Europa y África, recibe gran cantidad de inmigrantes procedentes de distintos países africanos además de ser paso obligado para muchos de ellos. Pero además es también destino elegido por muchos inmigrantes procedentes de países Sudamericanos y de países de Europa del Este por lo que el flujo migratorio y la diversidad poblacional es mayor aquí que en otras zonas geográficas.

Desde el año 2007, diferentes guías terapéuticas han incluido la recomendación de realizar un estudio de resistencias primarias en pacientes

que van a iniciar terapia antirretroviral (2, 3, 4, 5). Además, en 2009 la Organización Mundial de la Salud publicó las mutaciones de resistencia a antirretrovirales que deben ser estudiadas en el test de resistencias (10) (Figura 1).

Figura 1. Mutaciones recomendadas por la OMS para el estudio de transmisión de resistencias primarias

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

## 2.2 Interpretación genotípica de las resistencias a los antirretrovirales

Las resistencias a los antirretrovirales se deben a mutaciones o cambios en el genoma viral que se traducen en una disminución de la sensibilidad del VIH a uno o más fármacos. Dichas mutaciones se producen como consecuencia de una replicación viral persistente en presencia de concentraciones de los fármacos antirretrovirales. La aparición de mutaciones de resistencia es debida, principalmente a la dinámica de replicación del VIH ( $10^{10}$  partículas/día) y a que la transcriptasa inversa no tiene capacidad correctora de errores (actividad 3'-5' exonucleasa) (39, 40). Estos dos factores hacen posible que el VIH presente una elevada variabilidad genética (con una probabilidad de introducir una mutación puntual de  $10^{-4}$ ). Factores como un mala adherencia terapéutica, una farmacocinética variable de los fármacos así como interacciones farmacocinéticas y farmacodinámicas de los mismos y una baja penetración en determinados compartimentos corporales pueden conducir a niveles subterapéuticos in vivo, y éstos a la selección de resistencias, ya sean nuevas o reaparición de otras ya preexistentes. Estas resistencias no sólo afectan de manera directa al paciente que recibe el tratamiento antirretroviral, sino que, de forma indirecta, pueden afectar a individuos recién infectados mediante la transmisión de cepas portadoras de mutaciones de resistencia. Por ello se deben realizar estudios de resistencia a los pacientes nuevos diagnósticos y a los pacientes en tratamiento con sospecha de fracaso terapéutico (2, 3, 4, 5).

En cualquier caso, un genotipado no da idea cuantitativa del nivel de resistencia, sino que proporciona un listado de mutaciones cuyo significado cualitativo debe ser interpretado. Para ello, lo primero y más importante es conocer el significado de cada una de las mutaciones detectadas sin olvidar

que éstas pueden no tener importancia, o disminuir o incluso aumentar la sensibilidad del virus a los fármacos (mutaciones antagónicas). Por otra parte, constantemente se descubren nuevas mutaciones y la literatura existente al respecto es muy voluminosa y rápidamente variable, lo que hace la interpretación aún más difícil.

En función del número de mutaciones requeridas para reducir la actividad antirretroviral, podemos clasificar las diferentes familias de antirretrovirales como de baja barrera genética o de alta barrera genética, dependiendo de si se produce la pérdida de actividad en presencia de una única mutación o de si es necesaria la aparición de múltiples mutaciones. Así pues, los inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de nucleósidos (ITIAN) y los inhibidores de la proteasa (IP) se consideran, por norma general, antirretrovirales de elevada barrera genética. Por el contrario, los inhibidores de la transcriptasa reversa no análogos de nucleósidos (ITINAN) se consideran de baja barrera genética (41).

Existen diversos algoritmos disponibles para facilitar la interpretación de los resultados obtenidos al realizar una prueba genotípica de resistencias. Por lo general, se basan en la diferente puntuación dada a cada mutación y al establecimiento de puntuaciones de corte para cada nivel de sensibilidad (42, 43, 44) o al establecimiento de patrones de mutaciones cuya presencia conjunta se considera definitoria de resistencia (45).

## **2.3 Recomendaciones de inicio de tratamiento antirretroviral en pacientes *naïve*.**

### 2.3.1 Cuándo iniciar el TAR

Los principales motivos para iniciar la terapia antirretroviral son la reducción de la morbilidad y mortalidad asociada a la infección por VIH, la recuperación y preservación de la función inmunológica, evitar el efecto nocivo de la replicación del VIH sobre posibles comorbilidades existentes y la prevención de la transmisión del VIH. No existe ninguna duda sobre la necesidad de tratar a todos los pacientes con sintomatología relacionada con la infección por el VIH puesto que el tratamiento se relaciona con mejora de la supervivencia. En pacientes asintomáticos, los resultados de diferentes ensayos clínicos recomiendan iniciar tratamiento con menos de 500 CD4+/ $\mu$ L. Además, el incremento de la población tratada se ha relacionado con una disminución de las tasas de transmisión y por tanto, de la disminución de nuevas infecciones (46, 47). Por último, existen determinadas circunstancias en las que se debe recomendar con independencia de la situación inmunológica, como es el caso de las mujeres embarazadas (para disminuir el riesgo de transmisión materno-fetal), la coinfección por hepatitis B subsidiaria de tratamiento antiviral, o las parejas serodiscordantes que deseen disminuir al máximo el riesgo de transmisión del VIH.

### 2.3.2 ¿Qué combinación de antirretrovirales debe utilizarse?

Según el Documento de consenso de GeSIDA/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus

de la inmunodeficiencia humana (Actualización enero 2014), el tratamiento de elección de la infección por el VIH-1 en el momento actual consiste en una combinación de tres fármacos que incluyan dos ITIAN asociado a un ITINN, un IP/r o un InInt (Tabla 3). Pueden utilizarse las combinaciones de 2 ITIAN+1 ITINN, 2 ITIAN+1 IP/r o 2 ITIAN+1 InInt como TAR de inicio.

Dentro de la familia de los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIANs) se consideran como combinaciones de ITIAN de elección las formadas por TDF/FTC y por ABC/3TC (A-I). La mayor toxicidad relacionada con el uso de AZT, ddl y d4T no permite recomendar su uso en ninguna pauta de inicio.

Dentro de las combinaciones con ITIANs, EFV/TDF/FTC se considera una opción preferente de tratamiento (A-I). La combinación de EFV + ABC/3TC debe evitarse en pacientes con CVP mayor de 100.000 copias/mL (B-I). EFV está contraindicado durante el primer trimestre de la gestación. Se recomienda considerar otras opciones en mujeres que no utilicen métodos anticonceptivos eficaces. Asimismo, se debe evitar en pacientes que realicen tareas peligrosas si presentan síntomas de somnolencia, mareos y/o trastornos de la concentración (A-III). Está contraindicado el uso de NVP en mujeres con cifras de linfocitos CD4+ superiores a 250 células/ $\mu$ L y en varones con cifras superiores a 400 células/ $\mu$ L (A-II). El uso de Rilpivirina (RPV) no se aconseja en pacientes con carga viral inferior a 100.000 copias/ml. En los casos con carga viral superior su uso combinado con TDF + FTC se considera una opción preferente de tratamiento.

Como regímenes basados en IP preferentes se recomiendan ATV/r QD+TDF/FTC, y DRV/r QD+TDF/FTC (A-I). La combinación de ATV/r+ABC/3TC también se considera preferente, aunque debe usarse con precaución en pacientes con CVP superior a 100.000 copias/mL (A-I). Se consideran regímenes alternativos LPV/r, BID o QD, +TDF/FTC o ABC/3TC (B-I). Además, es posible utilizar también la combinación DRV/r+ABC/3TC,

aunque no ha sido formalmente investigada en ningún ensayo clínico (B-III). Por último, LPV/r+3TC y LPV/r+RAL pueden ser una alternativa a la triple terapia convencional cuando no se pueda utilizar TDF ni ABC (B-I).

En las recomendaciones de terapia de inicio basadas en inhibidores de la integrasa (INIs), Raltegravir (RAL) puede emplearse como tratamiento de inicio combinado con TDF/FTC (A-I) o ABC/3TC (A-I). Las combinaciones EVG/COBI/TDF/FTC y DTG con ABC/3TC (A-I) o TDF/FTC (A-I) pueden utilizarse como regímenes de TAR de inicio.

**Tabla 1. Combinaciones de TARGA de inicio recomendadas**

	3 <sup>er</sup> Fármaco	Pauta	Ensayos clínicos aleatorizados
PREFERENTES	ITINAN	TDF/FTC/EFV TDF/FTC/RPV	STARTMARK, ACTG 5202, GILEAD 934 ECHO, THRIVE, STAR
	IP/r	TDF/FTC + ATV/r ABC/3TC + ATV/r TDF/FTC + DRV/r	CASTLE, ACTG 5202, ARTEN, GS-US-236-0103 ACTG 5202 ARTEMIS, FLAMINGO
	Inint	ABC/3TC + DTG TDF/FTC + DTG TDF/FTC/EVG/COBI TDF/FTC + RAL ABC/3TC + RAL	SINGLE, FLAMINGO, SPRING-2 FLAMINGO, SPRING-2 GS-US-236-0102, GS-US-236-0103 STARTMARK, QDMRK, SPRING-2 SPRING-2
ALTERNATIVAS	ITINAN	ABC/3TC + EFV TDF/FTC + NVP	ACTG 5202, CNA30024 ARTEN, VERXVE
	IP/r	ABC/3TC + DRV/r TDF/FTC + LPV/r ABC/3TC + LPV/r	FLAMINGO ARTEMIS, ABT-730, CASTLE, GEMINI, HEAT, PROGRESS KLEAN, HEAT

## **2.4 Métodos de laboratorio para la detección de resistencias a antirretrovirales**

Los métodos disponibles en la actualidad para la detección de resistencias son de dos tipos: genotípicos y fenotípicos. Ambos se realizan generalmente a partir de muestras de plasma o suero, puesto que en él se encuentran las poblaciones de virus que contienen los cambios más recientes relacionados con el tratamiento antirretroviral. Sin embargo, algunos ensayos genotípicos también admiten también otras muestras, como líquido cefalorraquídeo, tejido linfóide o células mononucleares de sangre periférica. Se ha demostrado que existe una buena correlación entre ambos métodos, sobre todo con la familia de los ITINAN y menos con los ITIAN. La correlación es bastante más deficiente en pacientes multitratados y faltan datos para los fármacos más recientes (TDF, APV, ATV).

### **2.4.1 Métodos genotípicos.**

Los métodos genotípicos detectan mutaciones en el gen de la transcriptasa reversa y de la proteasa asociados con la aparición de resistencia. Sin embargo, el desarrollo de nuevas clases de fármacos antirretrovirales hace necesario también el análisis de otras regiones del genoma del VIH, como el gen env (para detectar resistencia a los inhibidores de la fusión) y la región de pol que codifica la integrasa. La determinación de resistencias por técnicas genotípicas ayuda a comprender los motivos del fracaso terapéutico, y en el caso de una determinada combinación terapéutica predice mejor el fracaso que el éxito de la misma. La mayoría de las técnicas actuales incluyen durante su realización la extracción del ARN viral y su posterior retrotranscripción en ADN. De este ADN se amplifica la región genómica que se desea investigar mediante

reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La secuenciación del ADN es el método genotípico de referencia para la determinación de la resistencia del VIH a los fármacos antirretrovirales. Se obtiene información completa de la secuencia de la región del genoma viral amplificada previamente por PCR, empleando *primers* o dideoxinucleótidos marcados de forma diferente para poder distinguirlos entre sí. Los productos de las reacciones de secuenciación se someten a electroforesis en gel y las bandas que se obtienen (cada una representando uno de los cuatro nucleótidos A, T, G o C) son leídas por el secuenciador. El resultado es una secuencia de nucleótidos que, una vez editada, se traduce en una secuencia de aminoácidos. Esta secuencia de aminoácidos se compara entonces con la de una cepa de referencia del VIH (cepa consenso) con el fin de determinar si existen mutaciones que confieran resistencia al tratamiento. Los dos ensayos de detección de mutaciones de resistencia aprobados por la FDA y con marcado CE más utilizados en la práctica clínica son: TRUGENE HIV-1 Genotyping Assay (Siemens NAD) and ViroSeq® HIV-1 Genotyping System (Celera-Abbott diagnostics) (48).

#### 2.4.2 Métodos fenotípicos.

Los métodos fenotípicos determinan la sensibilidad del virus a diferentes fármacos. La resistencia fenotípica se expresa en términos de concentración de fármaco necesaria para reducir la población viral en un 50% (IC50) o 90% (IC90). Este valor se compara con la concentración requerida para inhibir una cepa de referencia de laboratorio (o cepas aisladas en el mismo paciente antes del tratamiento antirretroviral) y se expresa como diferencia de veces entre ambas (*fold change* o *folds*). La interpretación de estos valores es diferente dependiendo del fármaco implicado.

Las técnicas fenotípicas más utilizadas en la actualidad para el estudio de resistencia a fármacos antirretrovirales son las técnicas de virus recombinantes y el fenotipo virtual.

## **2.5 Diversidad genética del VIH**

La alta tasa de variabilidad e inestabilidad genética son la causa de la elevada diversidad del VIH. El virus emplea los mecanismos de mutación y recombinación para provocar un alto grado de heterogeneidad entre subtipos.

### **2.5.1 Tipos.**

Se han identificado dos tipos de VIH: VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es el más extendido y el responsable de la mayor parte de casos de infección por VIH en el mundo. El VIH-2, identificado en 1986, tuvo inicialmente una distribución limitada geográficamente al África Occidental, pero actualmente en Europa se han comunicado ya más de un millar de casos de infección por el VIH-2. Ambos tipos de virus difieren en su epidemiología y en su historia natural. El VIH-2 es más cercano filogenéticamente al virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV) que al VIH-1, y parece ser menos patogénico y menos transmisible que el VIH-1. El tiempo de supervivencia tras el diagnóstico de SIDA también es más prolongado en pacientes infectados por VIH-2 que en aquellos portadores del VIH-1.

### 2.5.2 Grupos y subtipos.

Como resultado de los análisis filogenéticos basados en sus secuencias génicas (principalmente en los genes gag y env), el VIH-1 se clasificaron en tres grandes grupos: grupo M (main o principal), grupo O (outlier o lejano) y grupo N (no M, no O) (49). Cada uno de estos grupos tiene sus propias relaciones filogenéticas, lo que sugiere introducciones independientes del VIH-1 en la población humana. La mayoría de las cepas de VIH-1 pertenecen al grupo M, mientras que las de los grupos O y N provienen principalmente de África Central (50). El grupo M es el único del VIH-1 que ha sido subdividido en varios subtipos: A-D, F-H, J y K (los subtipos E e I sólo se han detectado en segmentos de cepas recombinantes). Algunos subtipos se clasifican a su vez en sub-subtipos, por ejemplo, el subtipo F está subdividido en dos subclases, F1 y F2. Los subtipos B y D deberían ser considerados como subclases de un único subtipo, pero por razones históricas es difícil cambiar estas designaciones (51). También dentro del subtipo A, se han descrito las cepas de la subclase A2.

El VIH-2 se clasifica en 8 subtipos, del A al H, siendo el subtipo C seguido en menor medida por los subtipos A, B, CRF02\_AG, CRF01\_AE, subtype G and D representando el 12, 11, 8, 5, 5 and 2% de las infecciones globales a nivel mundial por VIH (52). Hasta que una cepa reúne los criterios para ser definida como un nuevo subtipo nos referimos a ella como U (unclassified, no clasificada).

**Tabla 2. Clasificación del VIH**

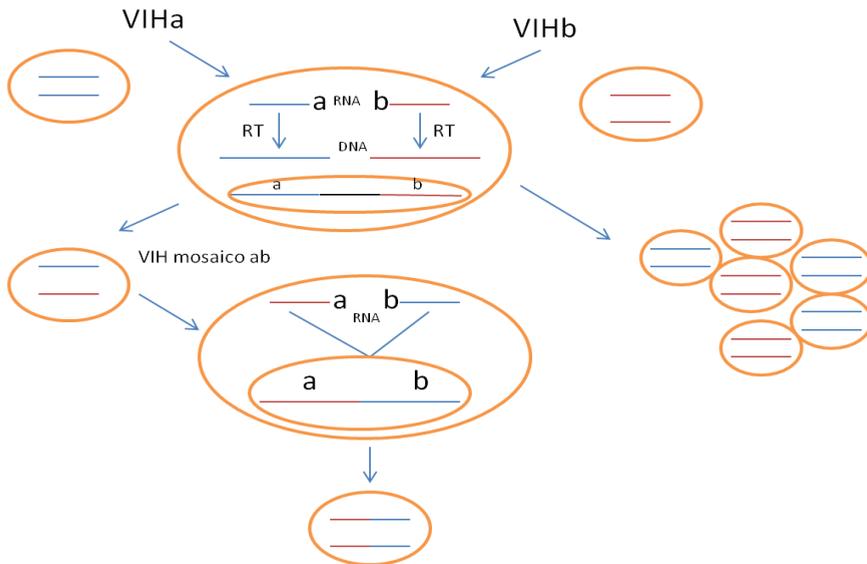
VIH-1	Grupo M ( <i>main</i> )	9 subtipos: A-D, F-H, J, K 65 CRFs
	Grupo O ( <i>outlier</i> )	
	Grupo N ( <i>new</i> )	
VIH-2	8 subtipos (A-H)	

### 2.5.3 Formas circulantes recombinantes (CRFs).

La secuenciación de genomas completos del VIH ha demostrado la existencia de recombinantes intersubtipo, llamados formas circulantes recombinantes (CRFs), taxonómicamente situadas al mismo nivel que los subtipos del grupo M. La recombinación constituye una fuente adicional de variación del VIH y desempeña un papel esencial en su evolución y en la expansión geográfica de los subtipos. Ocurre durante el paso de retrotranscripción y antes de la integración, cuando dos cepas diferentes del virus infectan a la misma célula (53), por lo que es más frecuente en áreas geográficas donde están presentes diferentes subtipos. Para que se produzca la recombinación, los dos provirus parentales distintos han de integrarse en el mismo núcleo. La expresión simultánea y el

empaquetamiento correcto del ARN viral generan una primera población heterocigota de partículas virales. La recombinación ocurre sólo tras la reinfección de esa primera generación de virus heterocigotos en nuevas células. Las dos hebras de ARN sirven de forma alternativa de molde para la síntesis del genoma proviral por la transcriptasa reversa generándose un virus recombinante (figura 2). La recombinación puede ocurrir entre diferentes genes o en diferentes regiones de un mismo gen, por lo que para su detección es necesario analizar distintas regiones genómicas del VIH.

**Figura 2. Recombinación del VIH**



Más de la mitad de los aislados de VIH-1 secuenciados hasta el momento son recombinantes. La recombinación permite mayores saltos evolutivos que las mutaciones puntuales y puede dar lugar a virus más resistentes a la presión selectiva del sistema inmune o de los antirretrovirales. Hasta el momento se han descrito 65 CRFs (tabla 3). Se designan con un número de identificación, indicativo del orden cronológico de su descubrimiento, seguido de unas letras colocadas en orden alfabético, indicativas de los subtipos que lo forman. Si el genoma contiene secuencias originarias de más de dos subtipos, las letras se reemplazan por “cpx” (*complex*).

También se han descrito recombinantes entre variantes del mismo subtipo (54, 55, 56), entre los grupos M y O y entre distintos CRFs; sin embargo, aunque se han descrito infecciones duales por VIH-1 y VIH-2, no se han detectado virus recombinantes entre ambos (57). Los genomas mosaico que no reúnen los requisitos necesarios para constituir un nuevo CRF se denominan URFs (formas recombinantes únicas o no clasificables).

**Tabla 3. Formas circulantes recombinantes (CRFs) del VIH-1 grupo M y subtipos que las componen**

NOMBRE	SUBTIPOS	NOMBRE	SUBTIPOS
CRF01_AE	A, E	CRF34_01B	CRF01, B
CRF02_AG	A, G	CRF35_AD	A, D
CRF03_AB	A, B	CRF36_cpx	CRF01, CRF02, A, G
CRF04_cpx	A, G, H, K, U	CRF37_cpx	CRF01, CRF02, A, G, U
CRF05_DF	D, F	CRF38_BF	B, F1
CRF06_cpx	A, G, J, K	CRF39_BF	B, F1
CRF07_BC	B', C	CRF40_BF	B, F1
CRF08_BC	B', C	CRF41_CD	C, D
CRF09_cpx	A, G, U	CRF42_BF	B, F1
CRF10_CD	C, D	CRF43_02G	CRF02, G
CRF11_cpx	A, E, G, J, U	CRF44_BF	B, F1
CRF12_BF	B, F1	CRF45_cpx	A, K, U
CRF13_cpx	CRF01, A, G, J, U	CRF46_BF	B, F1
CRF14_BG	B, G	CRF47_BF	B, F1
CRF15_01B	CRF01, B	CRF48_01B	CRF01, B
CRF16_A2D	A2, D	CRF49_cpx	A1, C, J, K, U
CRF17_BF	B, F1	CRF50_A1D	A1, D
CRF18_cpx	A1, F, G, H, K, U	CRF51_01B	CRF01, B
CRF19_cpx	A1, D, G	CRF52_01B	CRF01, B
CRF20_BG	B, G	CRF53_01B	CRF01, B
CRF21_A2D	A2, D	CRF54_01B	CRF01, B
CRF22_01A1	CRF01, A1	CRF55_01B	CRF01, B
CRF23_BG	B, G	CRF56_cpx	CRF02, B, G
CRF24_BG	B, G	CRF57_BC	B, C
CRF25_cpx	A, G, U	CRF58_01B	CRF01, B
CRF26_AU	A, U	CRF59_01B	CRF01, B
CRF27_cpx	A, E, G, H, J, K, U	CRF60_BC	B, C
CRF28_BF	B, F1	CRF61_BC	B, C
CRF29_BF	B, F1	CRF62_BC	B, C
CRF30_0206	CRF02, CRF06	CRF63_02A1	CRF02_AG, A
CRF31_BC	B, C	CRF64_BC	b, c
CRF32_06A1	CRF06, A1	CRF65_cpx	B, C, CRF01_AE
CRF33_01B	CRF01, B		

#### 2.5.4 Distribución geográfica de los subtipos del VIH.

Al comienzo de la epidemia, el VIH-1 y VIH-2 tenían la misma prevalencia pero estaban geográficamente separados: el VIH-1 predominaba en el este y centro de África, mientras que el VIH-2 se situaba principalmente en África Occidental (58). Posteriormente, las infecciones por VIH-1 del grupo M (con sus múltiples variantes) se expandieron mundialmente (59). El grupo O se refiere al grupo “externo” [“outlier”] y parece estar restringido al África Central y Occidental mientras que las infecciones por el grupo N se han identificado en África Central- Occidental, más concretamente en Camerún (60). A nivel mundial, las formas más prevalentes del VIH-1 grupo M son los subtipos A y C, junto con los recombinantes CRF02\_AG y CRF01\_AE. En la tabla 4 se muestra la distribución geográfica de los diferentes subtipos del VIH-1 y CRFs. Aunque inicialmente cada subtipo ocupaba un área geográfica definida, en la actualidad los límites geográficos entre subtipos van desapareciendo debido a la gran movilidad de la población por la emigración y el turismo. Entre otras consecuencias, esto favorece el aumento de las infecciones mixtas en regiones donde coexisten varios tipos de virus (61).

En África existe la mayor diversidad genética, coexistiendo prácticamente todos los subtipos aunque con grandes diferencias en su distribución entre las diferentes regiones. Los subtipos A y C y el recombinante CRF\_02 son los más prevalentes (62). En Europa Occidental, Norteamérica y Australia predomina el subtipo B, aunque paulatinamente se están introduciendo los subtipos no-B y distintos CRFs, especialmente en los países con gran afluencia de inmigración subsahariana. En Europa Oriental y Asia Central el subtipo A es el más prevalente, seguido del subtipo B, el CRF03\_AB y los subtipos C y F. En Tailandia las infecciones heterosexuales se deben principalmente a CRF01\_AE, mientras que la epidemia inicial entre UDVP fue debida a una variante del subtipo B. En la

India las cepas del subtipo C son responsables de la gran mayoría de las infecciones (63). En América Central y del Sur y el Caribe circula preferentemente el subtipo B; sin embargo, en Brasil también es frecuente el subtipo F, a excepción de los estados del sur del país donde son predominantes los subtipos C y CRF31\_BC (64) y se ha descrito una variante de B (Bb) entre los UDVP. En Argentina y Uruguay la forma recombinante CRF12\_BF posee la mayor prevalencia, especialmente en relación con UDVP (65).

**Tabla 4. Distribución mundial de los principales grupos y subtipos del VIH**

GRUPO	Subclasificación	Región
M	A (A1-A4)	África, Europa
	B	Europa, América, Tailandia, India, Australia
	C	África, India, Malasia
	D	África
	F	África Central Occidental
	G	África Central Occidental
	H	África Central Occidental
	J	África Central Occidental
CRF	K	África Central Occidental
	CRF01_AE	Sudeste de Asia
	CRF02_AG	África Occidental
	CRF03_AB	Rusia
	CRF04_cpx	África, Chipre, Grecia
	CRF05_DF	África Central
	CRF06_cpx	África Occidental
	CRF07_BC	China
	CRF08_BC	China
	CRF09_cpx	África Occidental
	CRF10_CD	Tanzania
	CRF11_cpx	África Central Occidental
	CRF12_BF	Argentina
	CRF13_cpx	África Central Occidental
	CRF14_BG	España, Portugal
CRF15_01E	Tailandia	
CRF16_A2D	Kenia	
URF	AC, AD, CD, ACD cpx	Kenia, Ruanda, Tailandia, Uganda, Nigeria, Camerún
	BF	Brasil, Argentina
	CRF01_AE/B	Tailandia, Myanmar (antigua Birmania)
O		Camerún, Senegal
N		Camerún

### 2.5.5 Implicaciones clínicas y epidemiológicas de los subtipos del VIH.

La mayoría de los primeros genomas analizados a nivel molecular y fenotípico del VIH-1 fueron variantes del subtipo B, que eran las formas más prevalentes en los países desarrollados. Por este motivo, gran parte de las investigaciones sobre biología y patogénesis del VIH-1 se realizaron con cepas de este subtipo. Sin embargo, las consecuencias sobre transmisibilidad, patogenicidad, diagnóstico, tratamiento y diseño de vacunas que resultan de la alta tasa de variabilidad genética del VIH hacen esencial la caracterización de los subtipos del VIH-1 que circulan en cada área geográfica. Basándose en las diferencias de transmisibilidad entre VIH-1 y VIH-2, se ha sugerido que ciertos subtipos pueden presentar un mecanismo predominante de transmisión (homosexual, heterosexual, vertical o parenteral), pero esto no ha sido aún demostrado. Algunos trabajos han encontrado diferencias entre los subtipos y el grado de progresión a SIDA (66), al contrario que otros (67). Las diferencias entre los resultados de estos estudios podrían deberse también a factores ajenos al virus (huésped, condiciones ambientales, diseño de los estudios, tamaño de muestra, duración del estudio). Los procedimientos diagnósticos, optimizados inicialmente para el diagnóstico del subtipo B, pueden dar resultados falsamente negativos o dudosos cuando se aplican a otros subtipos. De ahí la importancia de incorporar subtipos no-B en técnicas de diagnóstico de VIH, tanto serológico como molecular.

Sin embargo, la optimización de estas técnicas para subtipos y CRFs poco frecuentes puede ser difícil, dado el escaso número de secuencias completas de las que disponemos, lo que complica su validación. Igualmente, algunas de las técnicas de cuantificación de la carga viral se basan en el uso de primers diseñados frente a secuencias del subtipo B del VIH-1, que podrían no hibridar o hibridar defectuosamente con el genoma

de los aislados de subtipos no-B (68), lo que daría lugar a valores falsos de carga viral, indetectables o inferiores a los reales.

Con respecto a las técnicas de detección de mutaciones de resistencia a antirretrovirales, actualmente aún existen problemas de detección de resistencia en subtipos no-B tanto para los ensayos genotípicos como fenotípicos (69). La variabilidad genética también influye en la respuesta al tratamiento antirretroviral de los diferentes aislados. Se ha demostrado que los distintos subtipos del VIH-1 presentan diferencias de sensibilidad a los antirretrovirales. Así, por ejemplo, los ITINANs, activos frente al VIH-1, mostrando muy poca actividad frente al VIH-2 o VIH-1 grupo O. Igualmente, enfuvirtida presenta una acción específica frente al VIH-1 (70). Sin embargo, la eficacia de los diferentes antirretrovirales contra los virus no-B no es bien conocida.

## **Capítulo 3. Objetivos**



### Capítulo 3. Objetivos

El estudio ha sido realizado a partir de los datos recopilados en la cohorte de pacientes *naïve* de la Red de Investigación de SIDA (CoRIS) en tres periodos de corte que abarcan los años 2004 y 2011. Los objetivos del presente estudio son:

1. Describir la prevalencia global de mutaciones de resistencias primarias a VIH-1 en la Cohorte de pacientes *naïve* de la Red de Investigación de SIDA (CoRIS).
2. Estudiar la tendencia de la transmisión de resistencias primarias en el periodo de estudio.
3. Valorar la relación existente entre las mutaciones de resistencia descritas y las variables demográficas y clínicas de la población de estudio.
4. Estimar la prevalencia de resistencias primarias a los antirretrovirales recomendados en España de primera línea terapéutica y su influencia sobre los principales regímenes terapéuticos de inicio de tratamiento antirretroviral
5. Analizar la distribución de subtipos no-B detectados en el estudio, su evolución en el periodo de estudio y su relación con la transmisión de resistencias primarias.

## **Capítulo 4: Metodología**



## Capítulo 4: Metodología

### 4.1. Material

#### 4.1.1 Área y población de estudio

Para el siguiente estudio hemos contado con 2781 secuencias de pacientes VIH diagnosticados en sus respectivos centros sanitarios pertenecientes a una cohorte multicéntrica de carácter prospectivo, CoRIS, la cohorte de adultos de la Red de Investigación en SIDA, compuesta por un total de 7973 pacientes. La cohorte se inició en el año 2004, tiene carácter abierto con lo que son incluidos nuevos pacientes en las actualizaciones anuales.

La inclusión de pacientes se realizó siguiendo los criterios de CoRIS: paciente nuevo en el centro, con confirmación de diagnóstico de VIH, edad superior a 13 años y que no haya recibido tratamiento antirretroviral (paciente *naïve*).

El estudio 1 incluyó 683 secuencias de pacientes *naïve* incluidos en CoRIS desde Enero de 2004 a Noviembre de 2008 a partir de 18 centros de 7 Comunidades Autónomas de España. En el estudio 2 fueron incluidas 1864 secuencias de pacientes *naïve* que fueron incluidos en sucesivas actualizaciones de CoRIS en el periodo de tiempo desde Enero de 2007 a Noviembre de 2010. En este segundo estudio se consiguieron reclutar secuencias de 31 centros hospitalarios pertenecientes a 13 Comunidades Autónomas. En el estudio 3 fueron incluidos 2781 pacientes pertenecientes a CoRIS desde Enero del 2007 a Octubre de 2011. Para el estudio 3 se analizaron un total de 2781 secuencias FASTA de pacientes *naïve* de la cohorte CoRIS entre Enero de 2007 y Octubre de 2011. Las secuencias

fueron recolectadas de 23 centros hospitalarios de 10 Comunidades Autónomas diferentes.

#### 4.1.2 Datos demográficos y clínicos

Los datos demográficos y clínicos fueron recogidos y almacenados en la base de datos de CoRIS a partir de los formularios de inclusión de cada paciente en el momento de cada actualización de la cohorte.

Las variables evaluadas fueron: Recuento de CD4 y de la carga viral (CV) basal ( $\pm 2$  meses); duración de la infección en el momento de la muestra, tomando como infección reciente los primeros 12 meses de infección e infección crónica tiempos superiores; estadio CDC; historia de retraso diagnóstico, definido como recuentos de CD4 inferiores a 350 células/mm<sup>3</sup>; y variables sociodemográficas como sexo, edad, categoría de transmisión, nivel educativo y país de origen.

## 4.2 Métodos analíticos

### 4.2.1 Determinación de la carga viral

Los datos de la viremia basal de los pacientes fueron recopilados a partir del formulario de inclusión en CoRIS enviado por cada centro. La carga viral de los pacientes pertenecientes al área de Andalucía Oriental fue obtenida en el área de microbiología molecular del Hospital Universitario San Cecilio de Granada mediante la técnica automatizada de COBAS® TaqMan® Analyzer (Roche Diagnostics), que permite realizar

simultáneamente la amplificación y cuantificación de dicho material genético.

#### 4.2.2 Detección e interpretación de mutaciones de resistencia

La recopilación de las secuencias del gen de la proteasa y de la transcriptasa reversa necesarias para el estudio genotípico de resistencias a antirretrovirales se realizó en cada fecha de corte de estudio mediante el envío en formato fasta de ambas secuencias por parte de los centros colaboradores.

Las secuencias de los pacientes incluidos pertenecientes a la zona de Andalucía Oriental fueron obtenidas en el área de microbiología molecular del Hospital Universitario San Cecilio de Granada. El método de detección de resistencias empleado fue, en todos los casos, la técnica de secuenciación de ácidos nucleicos de TruGene™ HIV-1, Visible Genetics (Siemens). Esta técnica consta de 5 etapas:

- Extracción del ácido nucleico
- Amplificación mediante RT-PCR
- Reacción de secuenciación bidireccional
- Electroforesis en gel de poliacrilamida de los secuenciados
- Alineamiento de las secuencias e interpretación de los resultados

#### 4.2.3 Determinación del subtipo VIH

La determinación del subtipo viral se realizó a partir del gen de la proteasa y de análisis filogenéticos con la herramienta de subtipado de Therapy Edge™ (ABL, Louxembourg).

#### 4.2.4 Procesamiento de datos y análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa Stata software (V.11.1, Stata Corporation, College Station, Texas, USA).

Se llevó a cabo la descripción de resistencias a antirretrovirales y de subtipos no-B calculando los intervalos de confianza para los datos de prevalencia utilizando el cálculo de la varianza. También se analizó la asociación con las variables clínicas y sociodemográficas.

En el análisis univariante se incluyeron todas las variables seleccionadas en el estudio: recuento de CD4 y de la carga viral (CV) basal; duración de la infección en el momento de la muestra; estadio CDC; historia de retraso diagnóstico y las variables sociodemográficas como sexo, edad, categoría de transmisión, nivel educativo y país de origen.

El análisis bivariable fue realizado usando Chi-cuadrado o exacto de Fisher para las variables categóricas y Kruskal-Wallis para las variables continuas. Se aplicó el modelo de regresión logística múltiple para cuantificar el efecto de las variables sobre las TDR y los subtipos no-B. Por último, se calculó la tendencia lineal de ambos resultados en el periodo de tiempo del estudio mediante la prueba de tendencia de Chi-cuadrado.

## **Capítulo 5:**

### **Estudio de análisis de datos y resultados**



## **Capítulo 5: Estudio de análisis de datos y resultados**

### **5.1 Introducción**

Una vez descrita la metodología y los procedimientos empleados en el estudio, es este capítulo se analizarán los datos obtenidos para cada pregunta de investigación. Como se ha descrito en el apartado de “Procesamiento de datos”, el análisis estadístico de las variables demográficas y clínicas se expresará en niveles de probabilidad “ $p$ ”  $< 0.05$ . Así mismo, la prevalencia de resistencias primarias y distribución de subtipos no-B están descritas como medias con sus respectivos intervalos de confianza al 95%.

## 5.2 Análisis y resultados en cada pregunta de investigación

### **Estudio 1. *Transmission of HIV drug resistance and non-B subtype distribution in the Spanish cohort of antiretroviral treatment naïve HIV-infected individuals (CoRIS).***

#### 5.2.1 Población de estudio

Se incluyeron un total de 683 pacientes con infección por VIH pertenecientes a CoRIS desde Enero de 2004 a Noviembre de 2008. La mayor parte de la población de estudio fueron varones (85.9%), con una media de edad de 34 (29–41) años, de origen español (70.1%) e infectados por vía sexual, predominando hombres que tienen contacto sexual con otros hombres (61.2%). Respecto a las características virológicas de los pacientes incluidos, la media de la carga viral basal fue de 4.5 (4-5) log/ml y el nivel medio de CD4 fue de 395 (239-616) cel/mm<sup>3</sup>. Por último, cabe destacar que el 15.2% de los pacientes estaban infectados con un subtipo no B. La tabla 5 muestra con detalle las características basales globales y anuales de la población de estudio.

Tabla 5. Características demográficas de la población de estudio por año de inclusión en CoRIS

	2004		2005		2006		2007		2008		Total	
No.	38		55		111		304		175		683	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Género</b>												
Hombre	30	78.9	41	74.5	91	81.2	279	91.7	145	82.8	586	85.9
<b>Categoría de riesgo</b>												
UDVP	3	7.9	6	10.9	9	8.1	26	8.6	21	12	65	9.5
MSM	18	47.3	30	54.5	61	54.9	207	68.1	102	58.2	418	61.2
Heterosex	16	42.1	17	31	40	36.1	57	18.7	50	28.6	180	26.4
Otras	1	2.7	2	3.6	1	0.9	14	4.6	2	1.2	20	2.9
<b>Mediana Edad (años)</b>	33 (26-37.5)		35 (28-43)		36.5 (30-41)		33 (29-41)		36 (29-42.5)		34 (29-41)	
<b>Pais de origen</b>												
España	32	84.3	43	78.2	95	85.6	183	60.2	126	72	479	70.1
Europa occidental	0	0	2	3.6	2	1.8	12	3.9	0	0	17	2.5
Europa del este	1	2.6	1	1.8	1	0.9	4	1.3	5	2.8	12	1.8
Africa Subsahariana	0	0	2	3.6	1	0.9	9	3	5	2.8	17	2.5
Norte de Africa	1	2.6	1	1.8	0	0	6	2	8	4.7	16	2.3
Latinoamérica	3	7.9	5	9.2	12	10.8	86	28.3	26	14.9	132	19.3
Otros	1	2.6	1	1.8	0	0	4	1.3	5	2.8	10	1.5
<b>Mediana carga viral (Log copias/mL)</b>	4.7 (4-5.1)		4.4 (3.9-4.9)		4.4 (4-5.1)		4.5 (4-5)		4.5 (3.9-5)		4.5 (4-5)	
<b>Mediana recuento CD4 (cel/mm3)</b>	502 (361.5-729.9)		405 (271.5-568.5)		355 (209-602)		399 (245-618)		361 (210-571)		395 (239-616)	
<b>Subtipo No-B</b>	2	5.3	10	18.2	13	11.7	42	13.8	37	21.1	104	15.2

### 5.2.2 Estudio de la prevalencia de mutaciones de resistencia primarias en el periodo 2004-2008.

La prevalencia de transmisión de mutaciones asociadas a resistencias a antirretrovirales (TDR) durante el periodo de estudio (2004-2008) fue de 8.5% (95%IC: 6.6-10.8). Cuando lo analizamos por familias de antirretrovirales, la mayor prevalencia encontrada fue para los ITIANs, 4.4% (95%IC: 3.0-6.1), seguida de los ITINANs con un 4.0% (95%IC: 2.7-5.6) y los IPs con un 2.2% (95%IC: 1.3-3.5). Las principales mutaciones de resistencia primaria encontradas en el estudio fueron las revertientes T215 (3.8%; 95%IC: 2.6-3.5) y la K103N (3.2%; 95%IC: 2.1-4.8) (Tabla 2). La tabla 6 muestra los resultados de prevalencia de TDR globales y por familias de antirretrovirales en el periodo de estudio 2004-2008 mientras que la tabla 7 muestra la prevalencia de cada una de las mutaciones propuestas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). 10 pacientes (1.5%; 95%IC: 0.8-2.6) presentaron mutaciones de resistencia a dos familias de antirretrovirales y solo dos pacientes (0.3%; 95%IC: 0.0-1.0) a las tres familias.

**Tabla 6. Prevalencia de transmisión de resistencias a antirretrovirales durante el periodo de estudio**

Resistencia a ARV	2004 n=38		2005 n=55		2006 n=111		2007 n=304		2008 n=175		Total n=683		p de tendencia
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Cualquier clase	6	15.8	4	7.3	8	7.2	28	9.3	12	6.8	58	8.5	0.09
ITIAN	5	13.2	3	5.5	4	3.6	11	3.6	7	4	30	4.4	0.04
ITINAN	3	7.9	2	3.6	4	3.6	14	4.6	4	2.3	27	4	ns
IP	1	2.6	1	1.8	4	3.6	6	2	3	1.7	15	2.2	ns
a 2 clases											10	1.5	
a 3 clases											2	0.3	

\*ns: no significancia estadística.

**Tabla 7. Prevalencia de mutaciones de resistencia propuestas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el estudio de transmisión de resistencias**

IPs			ITIANs			ITINANs		
Mutación	(%)		Mutación	(%)		Mutación	(%)	
I54 V/L/M/A/S/T	0.7		T215 C/D/E/N/I/V/S	3,8		K103 N/S	3.2	
M46 I	0.7		D67 N/G	1,3		V106 I	2.8	
L90 M	0.7		K219 Q/E/R	1		G190 A/S/E/Q	0.7	
V32 I	0.4		M41 L	1.0		K101 E	0.3	
V82 A/F/T/S/M	0.4		L210 W	0.7		L100 I	0.1	
G73 C/S/T/A	0.3		M184 V/I	0,4		V106 A/M	0.1	
I47 A/V	0.3		T215 Y/F	0.3		Y181 C/I	0.1	
F53 L	0.3		T69 D	0.1		<b>Total</b>	<b>7,5</b>	
I50 V/L	0.1		K70 R	0.1				
I84 V/A/C	0.1		L74 V	0.1				
N88 D/S	0.1		V75 A/M/T/S	0.1				
<b>Total</b>	<b>6,4</b>		Q151 M	0.1				
			P157 S	0.1				
			<b>Total</b>	<b>9,5</b>				

### 5.2.3 Estudio de tendencia de la evolución de TDRs en el periodo de estudio 2004-2008.

Se observó una tendencia decreciente en la presencia de TDRs durante el periodo 2004-2008, de 15.8% (95%IC: 6.7-30.0) en 2004 a un 6.8% (95%IC: 3.8-11.4) en 2008 (p de tendencia = 0,09). Este hecho es debido principalmente al descenso de la presencia de mutaciones a ITIANs, de 13.2% (95%IC: 5.0-26.8) en 2004 a 4% (95%IC: 1.1-6.2) en 2008, respectivamente (p de tendencia=0.04) (Tabla 6).

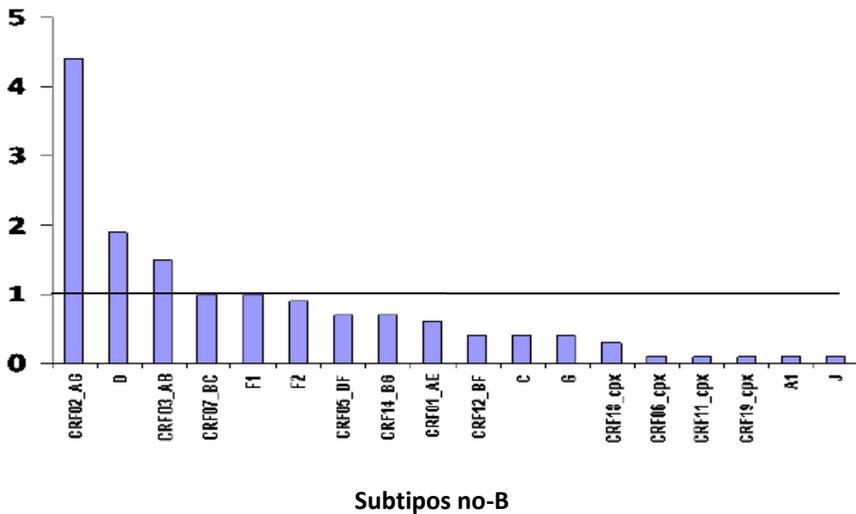
No se observó ninguna asociación entre TDR y las variables estudiadas, tales como género [OR para TDR 0.5 (0.3-1.0), p= 0.06], categoría de riesgo de infección VIH [UDVP, 0.6 (0,2-1.9); HSH, 0.82 (0.4-1.5), p=0.74 vs heterosexuales-HTX], país de origen [Europa occidental, 0.6 (0.08-5.1); Europa del este, 0.9 (0.1-7.1); África Subsahariana, 0.6 (0.08-4.8); Norte de África, 1.4 (0.3-6.4); Latinoamérica, 0.7 (0.3-1.5); p=0.88 vs España], edad, carga viral, recuento de CD4 basal o subtipo VIH.

### 5.2.4 Distribución de subtipos no-B en el periodo 2004-2008

La distribución de subtipos no-B y su asociación con factores demográficos es importante a la hora de recoger información a la hora de establecer de estrategias clínicas, epidemiológicas y de prevención en el campo de la infección por VIH en una región concreta. En este estudio, el 84.8% (95%IC: 81.9-87.3) de los pacientes fueron infectados por el subtipo B del VIH, mientras que 104 pacientes presentaban subtipos no-B (15.2%;

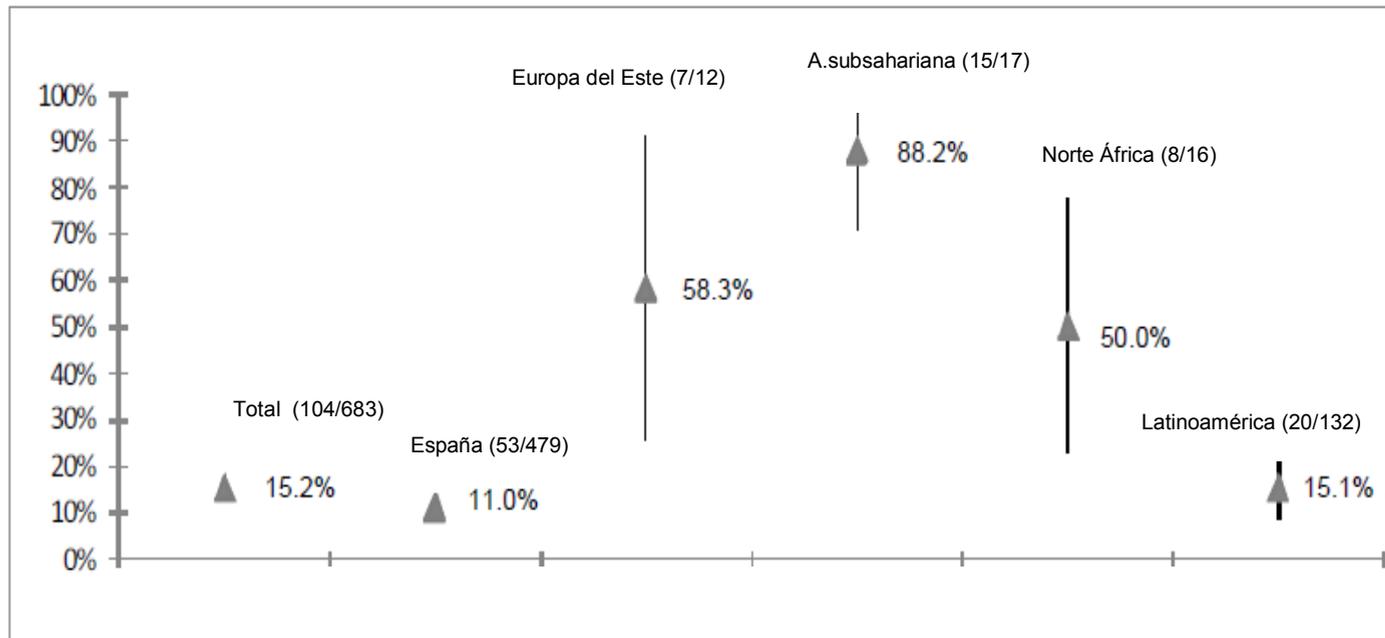
95%IC: 12.7-18.1). El subtipo no-B más prevalente fue el CRF02\_AG (4.4%, 95%IC: 3.0-6.1), seguido del subtipo D (1.9%; 95%IC: 1.1-3.2), CRF03\_AB (1.5%; 95%IC: 0.7-2.6), CRF07\_BC y el subtipo F1 (1%; 95%IC: 0.4-2.0); el resto de subtipos no-B encontrados presentaron una prevalencia < 1% [F2 (0.9%; 95%IC: 0.4-1.8), CRF05\_DF y CRF14\_BG (0.7; 95%IC: 0.3-1.6), CRF01\_AE (0.6%; 95%IC: 0.2-1.4), CRF12\_BF, subtipo C, y subtipo G (0.4; 95%IC: 0.1-1.2), CRF18\_cpx (0.3; 95%IC: 0.1-1.0), CRF06\_cpx, CRF11\_cpx, CRF19\_cpx, A1 subtipo A1, y subtipo J (0.1%; IC95: 0.0-0.7)] (Figura 3). Al igual que otros autores han informado (de Mendoza et al., 2005), Los subtipos no-B del VIH están claramente representados entre los pacientes con nuevo diagnóstico en España, siendo alrededor del 15% del total durante el periodo estudiado y el 21% en 2008.

Figura 3. Distribución de subtipos no-B en CoRIS (2004-2008)



Al estudiar el país de origen de los subtipos no-B, se observó que la mayor prevalencia de estos procedía de individuos procedentes del África Subsahariana (15/17, 88.2%), Europa del Este (7/12, 58.3%) y Norte de África (8/16, 50%), mientras que la prevalencia en los pacientes originarios de España fue mucho menor (53/479, 11%,  $p < 0.01$ ). Además, 2/3 de los subtipos no-B correspondieron a formas recombinantes circulantes (CRFs) (66.3%; 95%IC: 56.9-75.0) y 1/10 (10.1%; 95%IC: 8.0-10.5) del total de nuevos diagnósticos. La distribución de subtipos no-B según país de origen se refleja en la figura 4.

Figura 4. Prevalencia de subtipos no-B por origen geográfico en CoRIS (2004-2008)



**Estudio 2. *Analysis of transmitted drug resistance in Spain in the years 2007-2010 documents a decline in mutations to the non-nucleoside drug class.***

**5.2.5 Población de estudio**

En conjunto, se estudiaron 1864 pacientes incluidos dentro de la cohorte de pacientes naïve de la Red de Investigación de SIDA durante el periodo de tiempo 2007-2010. La tabla 8 muestra las características basales de la población incluida en el estudio. Las variables estudiadas fueron: sexo, edad, modo de transmisión, país de origen, carga viral, niveles de CD4, duración de la infección, estadio CDC, y la historia de retraso diagnóstico. La población de estudio se compuso principalmente de varones (87.3%) con una edad media de 33.9 (28.3-40.6) años de origen español en el 69.6% de los casos. El modo de transmisión VIH más prevalente fue el de contacto de hombres que practican sexo con otros hombres (68.8%), seguido por el contacto heterosexual (22.8%). Respecto a las características virológicas de la población de estudio, cabe destacar que la mayoría de pacientes estaban en un estadio A en el momento de su inclusión en la cohorte, con una carga viral de 4.6 (4.0-5.1) log copias/ml y niveles de CD4 de 383 (235-567) cel/mm<sup>3</sup>.

Si evaluamos los resultados interanuales, se observa que a lo largo del periodo de estudio hubo un aumento en la proporción de hombres que practican sexo con hombres (HSH) y de población con un alto nivel educativo ( $p < 0.01$ ) además de una tendencia en la realización del test de resistencias en estadios CDC tempranos ( $p= 0.01$ ) y una mayor proporción de personas sin una historia de retraso en el diagnóstico ( $p=0.05$ ). Otras

variables que podrían asociarse con un cambio en la indicación de las pruebas de resistencias como la carga viral (CV) o el recuento de CD4 no mostraron diferencias significativas a lo largo de los años estudiados.

**Tabla 8. Características basales clínicas y socio-demográficas de la población estudiada durante el periodo 2007-2010**

	2007		2008		2009		2010		Global		p
	452		506		498		408		N=1864		
	n	(%)									
<b>Sexo</b>											
Varón	407	(90.0)	414	(81.8)	442	(88.8)	365	(89.5)	1628	(87.34)	<0.01
Mujer	45	(10.0)	92	(18.2)	56	(11.2)	43	(10.5)	236	(12.7)	
<b>Edad media (IQ)*</b>											
	34.1 (28.2-41.9)		34.3 (28.6-41.1)		33.0 (27.9-39.7)		34.0 (28.3-40.2)		33.9 (28.3-40.6)		0.17
<b>Modo de transmisión</b>											
UDVP	32	(7.1)	43	(8.5)	22	(4.4)	21	(5.2)	118	(6.3)	<0.01
HSH	303	(67.0)	301	(59.5)	371	(74.5)	307	(75.2)	1282	(68.8)	
Heterosexual	110	(24.3)	152	(30.0)	96	(19.3)	67	(16.4)	425	(22.8)	
Otros/NA	7	(1.6)	10	(2.0)	9	(1.8)	13	(3.2)	39	(2.1)	
<b>País de origen</b>											
España	307	(67.9)	356	(70.4)	366	(73.5)	269	(65.9)	1298	(69.6)	0.29
Europa (otro)	20	(4.4)	28	(5.5)	21	(4.2)	24	(5.9)	93	(5.0)	
África	21	(4.7)	20	(4.0)	21	(4.2)	12	(2.9)	74	(4.0)	
América Latina	100	(22.1)	96	(19.0)	86	(17.3)	101	(24.8)	383	(20.5)	
Otros/Desconocido	4	(0.9)	6	(1.2)	4	(0.8)	2	(0.5)	16	(0.9)	
<b>Nivel educativo</b>											
Educación universitaria	107	(23.7)	131	(25.9)	153	(30.7)	131	(32.1)	522	(28.0)	<0.01

ESTUDIO DE ANÁLISIS DE DATOS Y RESULTADOS

Educación secundaria	165	(36.5)	167	(33.0)	169	(33.9)	140	(24.3)	641	(34.4)		
Educación primaria	107	(23.7)	141	(27.9)	97	(19.5)	94	(23.0)	439	(23.6)		
Sin estudios	13	(2.9)	13	(2.6)	17	(3.4)	2	(0.5)	45	(2.4)		
Dato desconocido	60	(13.3)	54	(10.7)	62	(12.5)	41	(10.1)	217	(11.6)		
Carga viral* (log copias/ml)	N	288		352		353		300		1293		0.38
	Mediana (IQ)	4.6 (4.1-5.1)		4.5 (4.0-5.0)		4.6 (4.1-5.1)		4.6 (4.1-5.1)		4.6 (4.0-5.1)		
Recuento CD4* (cel/mm3)	N	357		411		397		350		1515		0.08
	Mediana (IQ)	375 (223-567)		363 (226-545)		394 (251-591)		398.5 (245-580)		383 (235-567)		
Duración de la infección*												
Infección reciente	42	(9.3)	44	(8.7)	50	(10.0)	37	(9.1)	173	(9.3)	0.72	
Infección crónica	110	(24.3)	105	(20.8)	111	(22.3)	102	(25.0)	428	(23.0)		
No evaluable	300	(66.4)	357	(70.6)	337	(67.7)	269	(65.9)	1263	(67.8)		
Estadio CDC*												
A	377	(83.4)	432	(85.4)	450	(90.4)	365	(89.5)	1624	(87.1)	0.01	
B	40	(8.9)	31	(6.1)	22	(4.4)	22	(5.4)	115	(6.2)		
C	35	(7.7)	43	(8.5)	26	(5.2)	21	(5.2)	125	(6.7)		
Historia de retraso diagnóstico												
Sí	135	(29.9)	178	(35.2)	134	(26.9)	112	(27.5)	559	(30.0)	0.05	
No	229	(50.7)	240	(47.4)	271	(54.4)	230	(56.4)	970	(52.0)		
No evaluable	88	(19.5)	88	(17.4)	93	(18.7)	66	(16.2)	335	(18.0)		

\*En el momento del test de resistencias.

### 5.2.6 Estudio de la prevalencia de mutaciones resistencia primarias en el periodo 2007-2010.

Un total de 160 pacientes tuvieron al menos una mutación que confería resistencia a antirretrovirales. La prevalencia global de presencia de TDR en la población de estudio fue del 8.6 (95% IC: 7.3-9.9). Al analizar la prevalencia de TDR en cada familia de antirretrovirales, encontramos que la de la familia de ITIANs fue de 3.9% (95%IC: 3.0-4.8), los ITINANs de 3.9% (95%IC: 3.0-4.7) y la de los IPs de 2.3% (95%IC: 1.6-3.0). La tabla 9 muestra la prevalencia de TDR global y por familias de antirretrovirales.

El 1.2% de los pacientes estudiados (95%IC: 0.7-1.7) presentó TDR a 2 familias de antirretrovirales, mientras que la presencia de TDR a las 3 familias fue de 0,1% (95%CI: -0.02-0.3)

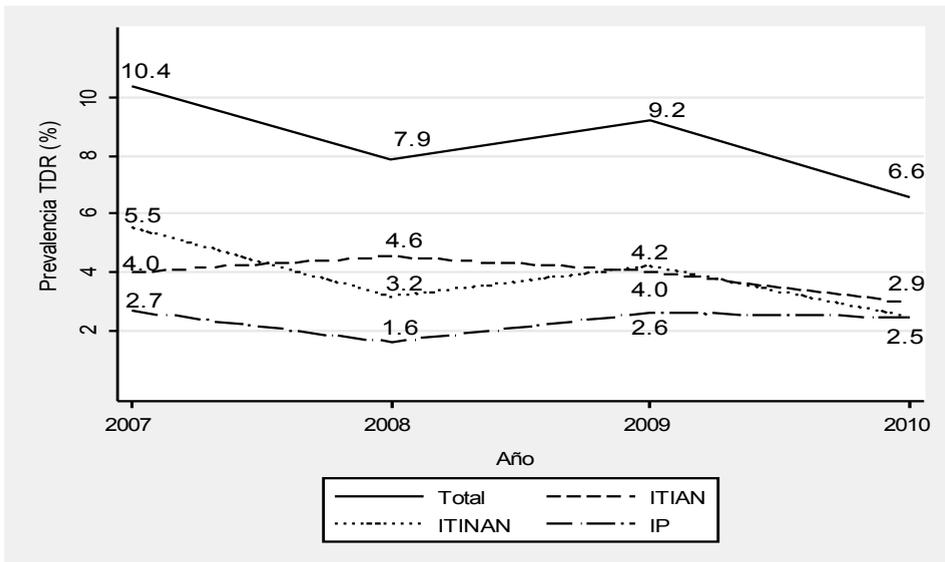
**Tabla 9. Prevalencia de mutaciones de resistencia de la lista de mutaciones de resistencia de la OMS**

Mutaciones ITIAN			Mutaciones ITINAN			Mutaciones IP		
Mutación	n	(%)	Mutación	n	(%)	Mutación	n	(%)
M41L	21	(1.1)	L100I	3	(0.2)	L24I	1	(0.05)
K65R	1	(0.05)	K103N/S	59	(3.1)	D30N	1	(0.05)
D67EGN	17	(0.9)	V106AM	0	(0.0)	V32I	3	(0.2)
T69D	3	(0.2)	Y181CIV	7	(0.4)	M46IL	12	(0.6)
K70ER	5	(0.3)	Y188CHL	3	(0.2)	I47AV	3	(0.2)
L74IV	4	(0.2)	G190AES	8	(0.4)	I50LV	1	(0.05)
F77L	1	(0.05)	P225H	1	(0.05)	F53LY	4	(0.2)
Y115F	2	(0.1)				I54ALMSTV	6	(0.3)
M184IV	9	(0.5)				G73ACST	1	(0.05)
L210W	2	(0.1)				L76V	1	(0.05)
T215 C/D/E/N/I/V/S	25	(1.3)				V82ACFLMST	6	(0.3)
T215YF	2	(0.1)				N83D	1	(0.05)
K219EQNR	22	(1.2)				I84ACV	0	(0.0)
TAMS	69	(3.7)				I85V	2	(0.1)
						N88DS	4	(0.2)
						L90M	13	(0.7)
1 mut.	42	2.2	1 mut.	61	3.3	1 mut.	36	1.9
2 mut.	25	1.3	2 mut.	11	0.6	2 mut.	2	0.1
≥3 mut.	6	0.3	≥3 mut.	0	0.0	≥3 mut.	5	0.3
Prevalencia	73	3.9	Prevalencia	72	3.9	Prevalencia	43	2.3
(95%IC)	(3.0-4.8)		(95%IC)	(3.0-4.7)		(95%IC)	(1.6-3.0)	

### 5.2.7 Tendencia de la evolución de resistencias primarias en el periodo de estudio 2007-2010.

El estudio de la evolución de resistencias a lo largo del periodo de estudio mostró una tendencia decreciente significativa en los ITINANs, de 5.5% (95%IC: 3.4-7.6) en 2007 a 2.4% (95%IC: 0.9-4.00) en 2010 ( $p$  de tendencia = 0.044), la cual explica el ligero descenso no significativo en la presencia de TDR globales por año ( $p$  de tendencia = 0.095). No se observaron cambios significativos ni relevantes al estudiar la tendencia en los ITIANs e IPs. La presencia de TDR a más de una familia de antirretrovirales fue inusual y no mostró tendencia alguna durante el periodo de estudio. En la figura 5 se muestra la evolución de resistencias primarias interanuales globales y por familia de antirretrovirales.

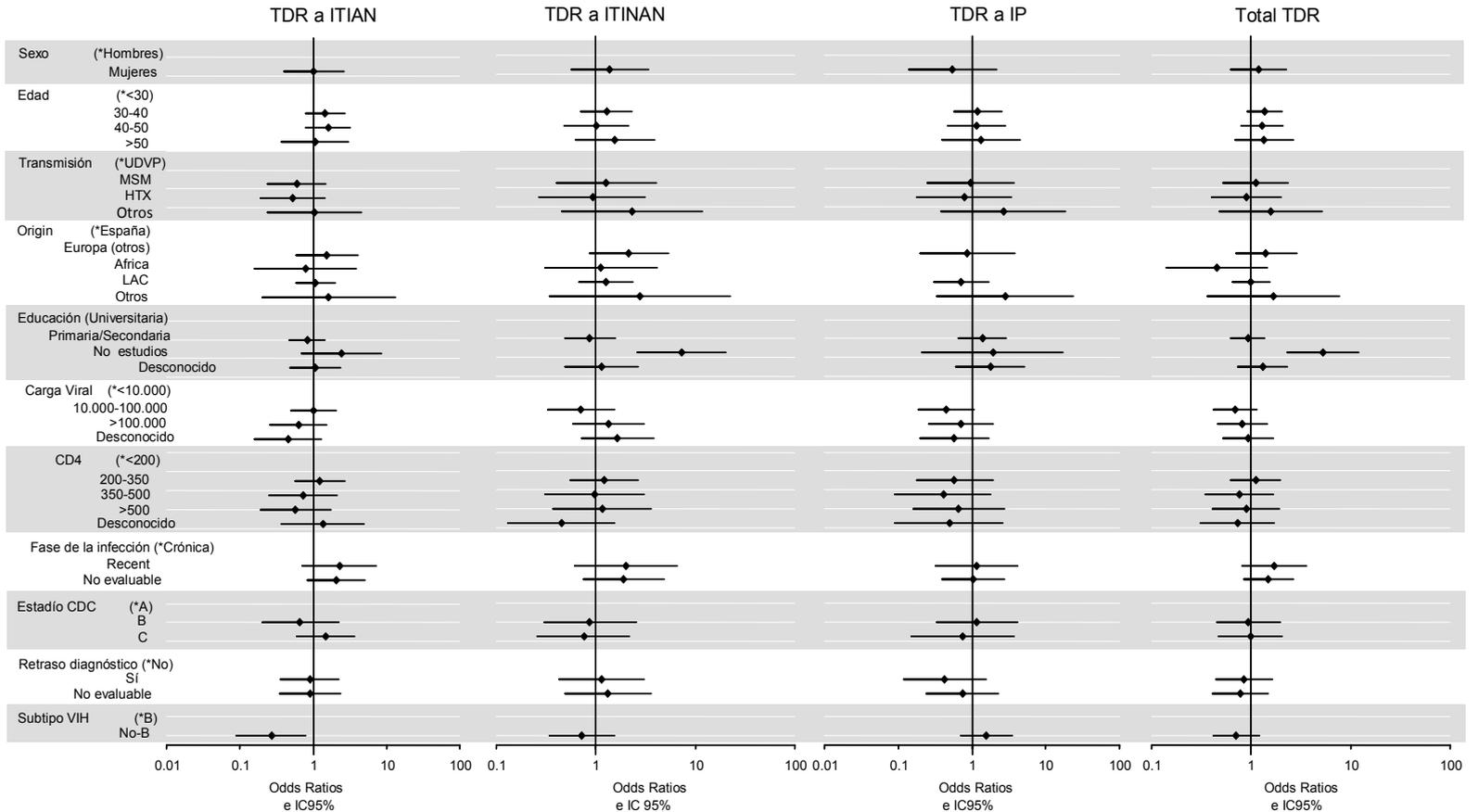
**Figura 5. Prevalencia de TDR por familias de antirretrovirales entre 2007 y 2010**



### 5.2.8 Estudio de la influencia de las variables clínicas y socio-demográficas sobre la presencia de mutaciones de resistencia primarias.

Solo el subtipo viral se asoció a presencia de TDR a la familia de los análogos de nucleósidos (ITIANs). Aquellos pacientes infectados con subtipos no-B tuvieron un 73% de menor riesgo de tener resistencias a antirretrovirales en relación a los infectados por un subtipo B (OR: 0.3; 95%IC 0.09-0.80). El hecho de carecer de estudios incrementó el riesgo de resistencia a los no análogos de nucleósidos (ITINANs) (OR: 7.3; 95%IC 2.6-20.2), comparándolos con aquellos individuos con un nivel educativo alto, además de observarse una tendencia no significativa de aumento en la presencia de resistencias a ITIANs. Los pacientes a los que se les realizó el test de resistencia en estadíos recientes de la infección no mostraron mayor riesgo de presentar resistencias a ITIANs o ITINANs. Ninguna de las variables estudiadas se asoció con TDR a la familia de los inhibidores de la proteasa (IPs), aunque, en pacientes con carga viral entre 10.000 y 100.000 copias/ml se observó una ligera disminución en el riesgo de tener resistencias a IPs. En la figura 6 se muestra la influencia de las variables estudiadas en forma de Odds Ratio (IC95) sobre la presencia de TDRs.

Figura 6. Influencia de las variables sociodemográficas estudiadas sobre la presencia de TDR



### 5.2.9 Análisis de la distribución de los subtipos no-B 2007-2010.

En nuestro estudio, la mayoría de pacientes se infectaron con subtipo B, siendo 297 los subtipos no-B aislados. La prevalencia de subtipos no-B fue de 15.9% (95%IC 14.3-17.6). Sin embargo, cabe destacar que la proporción de individuos infectados con subtipos no-B se incrementó a lo largo del periodo de estudio, de 11.9% (95%IC 8.9-14.9) en 2007 a 18.1% (95%IC 14.4-21.9) en 2010 (p de tendencia = 0.018).

Las formas recombinantes circulantes (CRF) supusieron el 61.9% (n=184) de los subtipos no-B, y el 9.87% del total de infecciones VIH. La figura 7 muestra la prevalencia de los subtipos no-B encontrados en el estudio. Los subtipos no-B más prevalentes fueron CRF02\_AG (4.2%; 95%IC 3.3-5.1), subtipo F1 (1.6%; 95%IC 1.0-2.2), subtipo D (1.5%; 95%IC 0.9-2.0), subtipo G (1.1%; 95%IC 0.6-1.5), y CRF12\_BF (1.0%; 95%IC 0.6-1.5). El resto de subtipos no-B y CRFs encontrados se hallaron en porcentajes inferiores al 1%. (Figura 19). Además, La tendencia en la evolución de la presencia de subtipos no-B durante el periodo 2007-2010 se refleja en la figura 8.

Figura 7. Prevalencia de los subtipos no-B del HIV en el periodo 2007-2010

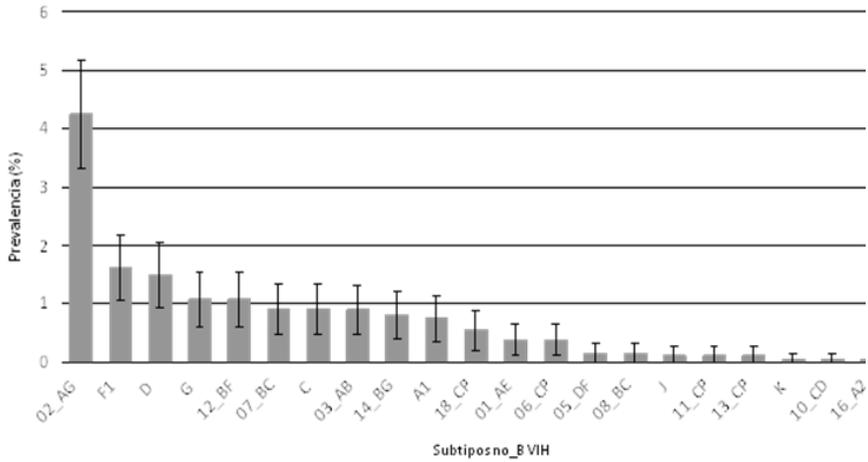
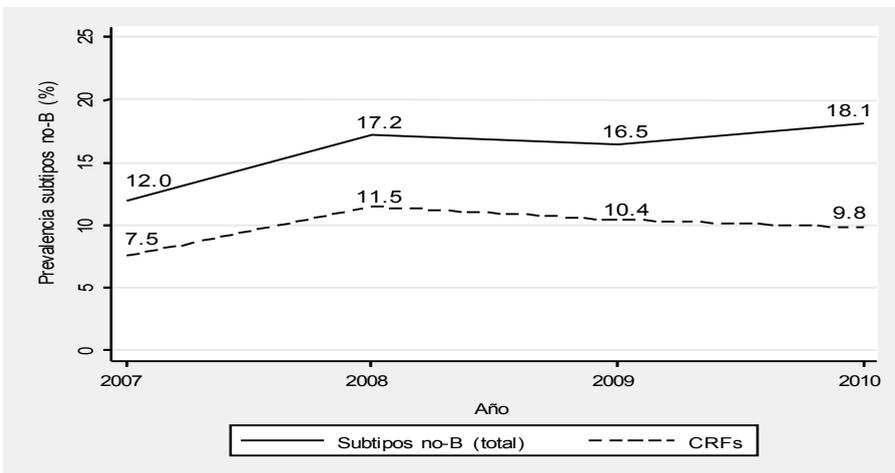


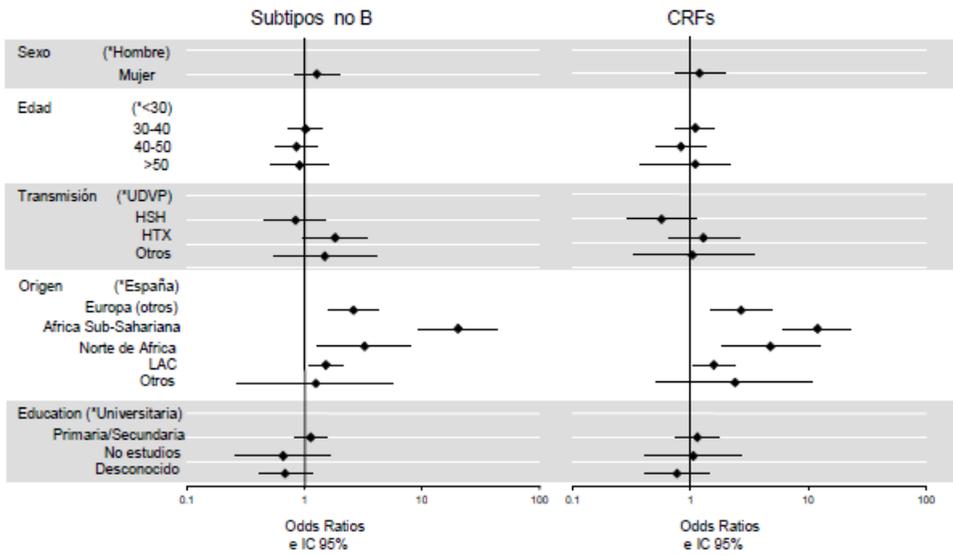
Figura 8. Tendencia en la evolución de la presencia de subtipos no-B durante el periodo 2007-2010



Finalmente se estudió la asociación entre la presencia de subtipos no-B y las variables sociodemográficas incluidas en el estudio (Figura 9). Se observó que los pacientes de otros países que no fueran España tenían un riesgo más elevado de ser infectados por un subtipo no-B, siendo la mayor prevalencia para individuos del África Subsahariana (81.8%; 95%IC 69.7-91.8), seguido de originarios del Norte de África (36.4%; 95%IC 14.5-58.2), personas de Europa Central u oeste (28.0%; 95%IC 18.7-37.2) y de origen latinoamericano (17.2%; 95%IC 13.4-21.0). La prevalencia de subtipos no-B encontrada en pacientes de origen español fue mucho menor (11.8%; 95%IC 10.0-13.5). La presencia de CRFs fue también mayor en individuos de otros países.

Además, se observó que los pacientes cuya vía de infección VIH fue la heterosexual tenían una mayor probabilidad de infectarse con un subtipo no-B (OR 1.8; 95%IC 1.0-3.4), teniendo esta relación una significación estadística límite ( $p=0.053$ ).

**Figura 9. Efecto de las variables sociodemográficas en la probabilidad de infección por un subtipo no-B de VIH o de formas recombinantes circulantes (CRFs)**



---

**Estudio 3. *Clinically relevant transmitted drug resistance to first line antiretroviral drugs and implications for recommendation***

## 5.2.10 Población de estudio y métodos.

Se analizaron un total de 2781 secuencias FASTA de pacientes *naïve* de la cohorte CoRIS entre Enero de 2007 y Octubre de 2011. Las secuencias fueron recolectadas de 23 centros hospitalarios de 10 Comunidades Autónomas diferentes, aceptándose para el análisis final únicamente los fastas de secuencias *naïve* con una calidad media o alta, asociándose a sus respectivos datos clínicos y socio-demográficos recopilados en la base de datos de CoRIS. Se analizó la presencia de mutaciones de resistencia primaria en la población de estudio, basándose en la lista de mutaciones de transmisión de resistencias de la Organización Mundial de la Salud publicada por Bennett et al en 2009, así como la sensibilidad a los fármacos antirretrovirales recomendados como de uso en primera línea en España. Para ello, se recodificaron las categorías del algoritmo de interpretación de Stanford “Susceptible” y “Potential low level resistance” como “sensible” y “Low level resistance”, “Intermediate resistance” y “Resistance” como “Resistente”. Para el posterior estudio del score de sensibilidad genotípica (GSS, Genotypic Sensibility Score), “Susceptible” y “Potential low level resistance” fueron puntuadas como 1, “Low level resistance”, “Intermediate resistance” como 0,5, y “Resistance” como 0.

En este estudio, la población se compone, principalmente, de hombres, infectados por transmisión de contacto sexual con otros hombres, con un alto nivel educacional, originarios de España y Latinoamérica y reclutados en estadios tempranos de la enfermedad VIH.

Cabe destacar el incremento en el tiempo de la proporción de hombres infectados por contacto sexual con otros hombres, y de pacientes con un estadio CDC temprano y de niveles altos de CD4 en nuestra población de estudio. Una descripción detallada de la población de estudio se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Características basales de la población de estudio

	2007 (N=484)		2008 (N= 582)		2009 (N= 596)		2010 (N=756)		2011 (N=363)		Total (N=2,781)		p
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
<b>Sexo</b>													<0.01
Varón	436	(90.1)	481	(82.6)	529	(88.8)	683	(90.3)	326	(89.8)	2,455	(88.3)	
<b>Edad</b>													0.37
Mediana (IQR)	33.8 (28.3- 41.0)		34.3(28.2- 41.5)		33.2(28.0- 39.7)		34.5(28.5- 41.6)		33.8(27.3- 42.3)		33.9 (28.2-41.0)		
<b>Modo of transmisión</b>													<0.01
UDVP	35	(7.2)	47	(8.1)	27	(4.5)	38	(5.0)	14	(3.9)	161	(5.8)	
HSH	321	(66.3)	347	(59.6)	429	(72.0)	550	(72.8)	278	(76.6)	1,925	(69.2)	
Heterosexual	119	(24.6)	178	(30.6)	126	(21.1)	140	(18.5)	63	(17.4)	626	(22.5)	
Otros/NA	9	(1.9)	10	(1.7)	14	(2.4)	28	(3.7)	8	(2.2)	69	(2.5)	
<b>País de origen</b>													0.07
España	331	(68.4)	408	(70.1)	435	(73.0)	513	(67.9)	262	(72.2)	1,949	(70.1)	
África	22	(4.5)	23	(4.0)	27	(4.5)	23	(3.0)	7	(1.9)	102	(3.7)	
Latinoamérica	106	(21.9)	108	(18.6)	106	(17.8)	174	(23.0)	67	(18.5)	561	(20.2)	
Otros/desconocido	25	(5.2)	43	(7.4)	28	(4.7)	46	(6.1)	27	(7.4)	169	(6.1)	
<b>Nivel educativo</b>													<0.05
Bajo	127	(26.2)	175	(30.1)	148	(24.8)	191	(25.3)	88	(24.2)	729	(26.2)	
Alto	299	(61.8)	341	(58.6)	380	(63.7)	503	(66.5)	244	(67.2)	1,767	(63.5)	
Desconocido	58	(12.0)	66	(11.3)	68	(11.4)	62	(8.2)	31	(8.5)	285	(10.3)	
<b>Carga Viral (log copias/ml)</b>													0.11
N	349		429		440		622		291		2,131		
Mediana (IQR)	4.5 (4.0-5.1)		4.6 (4.0-5.0)		4.6 (4.0-5.1)		4.6 (4.1-5.1)		4.7 (4.2-5.2)		4.6 (4.1-5.1)		
<b>Recuento CD4 (cels/mm3)</b>													<0.05
N	416		501		503		699		330		2,449		
Mediana (IQR)	392 (237-604)		371 (223- 559)		396 (251- 593)		413 (276-580)		432(260-606)		399 (251-588)		
<b>Duración de la infección</b>													0.96
Infección reciente	43	(8.9)	47	(8.1)	51	(8.6)	70	(9.3)	34	(9.4)	245	(8.8)	
Infección crónica	112	(23.1)	121	(20.8)	138	(23.1)	169	(22.3)	76	(20.9)	616	(22.2)	
No evaluable	329	(68.0)	414	(71.1)	407	(68.3)	517	(68.4)	253	(69.7)	1,92	(69.0)	
<b>Estadio CDC</b>													<0.05
P/A	402	(83.6)	492	(84.8)	537	(90.2)	658	(87.2)	326	(89.8)	2,415	(87.1)	
B	40	(8.3)	38	(6.6)	29	(4.9)	53	(7.0)	23	(6.3)	183	(6.6)	
C	39	(8.1)	50	(8.6)	29	(4.9)	44	(5.8)	14	(3.9)	176	(6.3)	
<b>Historia de retraso diagnóstico</b>													<0.05
Sí	149	(30.8)	205	(35.2)	169	(28.4)	218	(28.8)	114	(31.4)	855	(30.7)	
No	248	(51.2)	277	(47.6)	325	(54.5)	439	(58.1)	192	(53.0)	1,481	(53.3)	
No evaluable	87	(18.0)	100	(17.2)	102	(17.1)	99	(13.1)	57	(15.7)	445	(16.0)	

### 5.2.11 Estudio de la prevalencia de transmisión de resistencias primarias en la población de estudio en el periodo 2007-2011.

De las 2781 secuencias estudiadas, 221 tuvieron al menos una mutación recogida en la lista OMS de mutaciones asociadas a transmisión de resistencias (TDR), resultando una prevalencia de 7.9% (95%IC: 6.9-9.0). Por familias de ARV, se encontró una similar prevalencia en los inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de nucleósidos (ITIANs) y no análogos de nucleósidos (ITINANs), siendo de 3.6% (95%IC: 2.9-4.3) y de 3.7% (95%IC: 3.0-4.7) respectivamente. Para los inhibidores de la protease (IPs), la prevalencia fue menor, de 1.7% (95%IC: 1.2-2.2).

La TDR a más de una familia de ARV fue anecdótica. Tan sólo el 1,0% de los pacientes de la cohorte CoRIS (95%IC: 0.6-1.3) mostró TDR a al menos 2 clases de ARV y el 0,1% (95%IC: 0.0-0.2) a las 3 familias. TDR a 2 clases de ARV decreció de 1.5% en 2007 a 0.3% en 2011 (p de tendencia=0.06)

La Tabla 10 muestra las mutaciones más prevalentes recogidas en la lista de vigilancia de la OMS. La principal mutación asociada a TDR en la familia de los ITINANs fue la K103N/S, con una prevalencia de 2.8% (95%IC 2.2-3.4). En la familia de los ITIANs, tres fueron las mutaciones de Resistencia primaria principales: Las revertientes de la T215 (C/D/E/N/I/V/S) (1.3%; 95%IC 0.9-1.8), M41L (1.2%; 95%IC 0.8-1.5) y la K219EQNR (1.0%; 95%IC 0.7-1.4). Para los IPs, la principal mutación responsable de TDR fue la M46IL (0.9%; 95%IC 0.6-1.3). Cabe destacar que la presencia de TDR con una sola mutación se dio en el 55,5% de los casos a ITIANs, 85.3% en los ITINANs y en el 93.8% en los IPs.

**Tabla 10. Prevalencia de mutaciones primarias de resistencia en CoRIS durante el periodo de estudio 2007-2011**

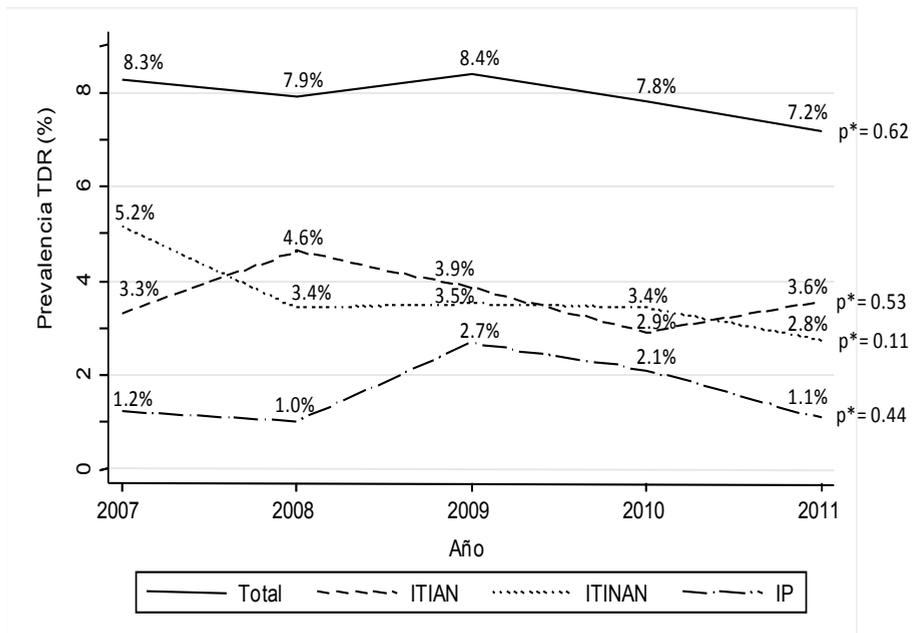
ITIAN			ITINAN			IP		
Mutación	N	(Pv, %)	Mutación	n	(Pv, %)	Mutación	n	(Pv, %)
M41L	32	(1.15)	L100I	2	(0.07)	L24I	2	(0.07)
K65R	1	(0.04)	K101EP	8	(0.29)	D30N	1	(0.04)
D67EGN	23	(0.83)	K103N/S	77	(2.77)	V32I	2	(0.07)
T69D	5	(0.18)	Y181CIV	9	(0.32)	M46IL	26	(0.93)
K70ER	5	(0.18)	Y188CHL	5	(0.18)	I47AV	2	(0.07)
L74IV	3	(0.11)	G190AES	11	(0.40)	F53LY	2	(0.07)
F77L	2	(0.07)	P225H	3	(0.11)	I54ALMSTV	2	(0.07)
Y115F	2	(0.07)	M230L	1	(0.04)	V82ACFLMST	5	(0.18)
M184IV	13	(0.47)				N83D	1	(0.04)
L210W	12	(0.43)				I85V	1	(0.04)
T215REV*	37	(1.33)				N88DS	2	(0.07)
T215YF	2	(0.07)					10	(0.36)
K219EQNR	29	(1.04)				L90M		
1 mut.	56	(2.01)	1 mut.	87	(3.13)	1 mut.	45	(1.62)
2 mut.	32	(1.15)	2 mut.	13	(0.47)	2 mut.	2	(0.07)
≥3 mut.	13	(0.47)	≥3 mut.	2	(0.07)	≥3 mut.	1	(0.04)
Prevalencia			Prevalencia			Prevalencia		
(95%IC)	3.6	(2.9-4.3)	(95%IC)	3.7	(3.0-4.4)	(95%IC)	1.7	(1.2-2.2)

\*=C/D/E/N/I/V/S.

5.2.12 Estudio de la tendencia de la transmisión de resistencias primarias en el periodo 2007-2011

No se encontraron variaciones significativas en la tendencia interanual de la prevalencia global de TDRs ni por clases de ARV. En la Figura 10 se muestra la evolución de la prevalencia de TDRs entre los años 2007 y 2011.

Figura 10. Prevalencia de TDR por clases de antirretrovirales entre 2007 y 2011



\*valor p para la prueba de tendencia Chi-cuadrado.

### 5.2.13 Resistencias primarias a los antirretrovirales de primera línea en la Cohorte de pacientes *naïve* de la Red de Investigación de SIDA (CoRIS)

Al investigar las prevalencia de transmisión de Resistencia con relevancia clínica recomendados para regímenes iniciales de tratamiento, el número de pacientes que mostraron alguna resistencia fue de 188, obteniéndose una prevalencia total de 6.8% (95%IC 5.8-7.7). La prevalencia de la transmisión de Resistencia con relevancia clínica a los ARV de primera línea fue inferior que la prevalencia de TDR para los ITIANs [2.3% (95%IC 1.8-2.9)] y los IPs [0.8% (95%IC 0.4-1.1)], mientras que aumento para los ARV ITINANs [4.6%; (95%IC 3.8-5.3)]. De hecho, solo el 70,1% de pacientes que presentaban TDRs mostraron transmisión de Resistencias con relevancia clínica. Para los ITIANs, las mutaciones responsables de presencia de TDR pero sin transmisión de Resistencia con relevancia clínica a los fármacos de primera línea fueron principalmente mutaciones únicas: mutaciones asociadas a Timidina (TAMs) aislada (M41L, n=8; T69D, n=1; K70R, n=1; L210W, n=4; K219N/Q, n=7), revertientes T215 aislada (D/N/S n=7), una F77L aislada (n=2), o la combinación de D67N+K219Q (n=4), o D67N+T69D (n=1). Para los IPs, las mutaciones responsables de estas discordancias se detectaron siempre de forma aislada (L24I, n=1; D30N, n=1; M46I/L, n=24; F53Y, n=1, V82L, n=2 and N88D, n=2). De otro modo, el incremento de resistencia con relevancia clínica con respecto a la prevalencia de TDR en los ITINANs fue debida, principalmente, a la combinación de dos o más mutaciones no presentes en la lista OMS (V90I+V108I+H221Y, n=1; A98G+V179E, n=1; V108I+E138A, n=3; V108I+V179E, n=2; E138A+V179D, n=2; E138A+V179D+Y188H, n=1; V179D+ V106I, n=1), y en siete casos por la presencia de una mutación A98G aislada. La Figura 2 muestra la prevalencia de PDR a los ARV recomendados como de primera línea. Se observó un significativo descenso

desde el 2007 (8.1%) al 2011 (4.7%) que se explica por el descenso casi estadísticamente significativo en los ITIANs y los ITINANs. Los IPs no mostraron ninguna tendencia decreciente. La PDR a dos o tres familias de ARV fue baja, de 0.8% (IC95% 0.5-1.2) y de 0.04% (IC95% 0.0-0.1), respectivamente.

Si analizamos individualmente la prevalencia de transmisión de Resistencia con relevancia clínica de los ITIANs de primera línea, para Abacavir (ABC) fue de 2.2% (95%IC 1.7-2.8), para Emtricitabina (FTC) y Lamivudina (3TC) de 0.7% (95%IC 0.4-1.0) y de 1.6% (95%IC 1.1-2.1) para Tenofovir (TDF). Para los ITINANs, la resistencia observada para Efavirenz (EFV) y Nevirapina (NVP) fue de 4.0% (95%IC 3.3-4.8) y 4.6% (95%IC 3.8-5.3). Finalmente, en la familia de los IPs, Atazanavir (ATV) tuvo una prevalencia de PDR de 0.7% (95%IC 0.4-1.0), 0.1% (95%IC 0.0-0.3) para Darunavir (DRV), y 0.3% (95%IC 0.1-0.5) para Lopinavir (LPV).

La tabla 11 muestra las resistencias a estos ARV observadas al combinarlos en los regímenes terapéuticos recomendados de primera línea. Los principales regímenes afectados son que contienen un ITINAN, variando del 5.6% al 6.2% en función de los fármacos acompañantes del ITINAN. La resistencia en regímenes basados en IPs fue menos común, entre el 2.2% y 2.7%. Al considerar aquellos regímenes con dos ARV plenamente efectivos (Sensibles) y uno parcialmente efectivo (Sensibilidad intermedia) (GSS=2.5 para un régimen de tres fármacos), se puede observar como el número de pacientes infectados con cepas VIH con mutaciones de resistencia con impacto en la actividad de los regímenes terapéuticos de primera línea desciende de los 188 iniciales a 115. En este caso, las mutaciones de resistencia afectan a las combinaciones basadas en ITINAN entre un 3.4% y 3.9% de los casos, y a los basados en IPs entre un 0.7% y 0.9%.

Tabla 11. Barrera terapéutica de los regímenes ARV de primera línea utilizando el algoritmo de interpretación de Stanford

Régimen ARV			Umbral de resistencia* <2.5		Umbral de resistencia * <3	
			n	(%)	n	(%)
EFV	TDF	FTC	94	(3.4)	155	(5.6)
		3TC	94	(3.4)	155	(5.6)
	ABC	FTC	95	(3.4)	157	(5.7)
		3TC	95	(3.4)	157	(5.7)
NVP	TDF	FTC	109	(3.9)	169	(6.1)
		3TC	109	(3.9)	169	(6.1)
	ABC	FTC	109	(3.9)	171	(6.2)
		3TC	109	(3.9)	171	(6.2)
LPV	TDF	FTC	20	(0.7)	64	(2.3)
		3TC	20	(0.7)	64	(2.3)
	ABC	FTC	20	(0.7)	68	(2.5)
		3TC	20	(0.7)	68	(2.5)
ATZ	TDF	FTC	25	(0.9)	72	(2.6)
		3TC	25	(0.9)	72	(2.6)
	ABC	FTC	26	(0.9)	75	(2.7)
		3TC	26	(0.9)	75	(2.7)
DRV	TDF	FTC	19	(0.7)	61	(2.2)
		3TC	19	(0.7)	61	(2.2)
	ABC	FTC	19	(0.7)	65	(2.3)
		3TC	19	(0.7)	65	(2.3)
<b>≥ Regímenes afectados</b>			115	(4.1)	188	(6.8)

\*Umbral de la puntuación de sensibilidad genotípica para determinar la cepa como resistente a una combinación dada de ARV.

## **Capítulo 6.**

### **Discusión y conclusiones**



## Capítulo 6. Discusión y conclusiones

### 6.1 Discusión

La prevalencia de TDRs a lo largo de los tres periodos de estudio que abarcaron del año 2004 al 2011 fue de entorno al 8% (8,5% en el periodo 2004-2008 y 2007-2010: 7,9% en el periodo 2007-2011).

Estos datos son similares a los reportados por los dos grandes estudios publicados a nivel europeo: el estudio SPREAD (71) y el Eurocord-CHAIN joint project (72), y a otros estudios europeos realizados a nivel nacional como los presentados en Alemania, Dinamarca e Irlanda (73, 74, 75), y a otros ya presentados con anterioridad en Reino Unido (76) y Francia (77) los cuales sitúan la prevalencia de TDR en Europa en torno al 9%. Cabe destacar el descenso en la presencia de TDR desde el 2007 al 2011 y la escasa presencia de resistencias a más de una familia de ARV. Estos dos hechos pueden tener importantes implicaciones en la confección de guías de recomendación de tratamiento ARV en el futuro. La presencia de una mayor prevalencia de TDRs en los años iniciales del estudio podría explicarse por la inclusión de pacientes de grupos de alto riesgo en los años iniciales del estudio ya que la recomendación de realizar un test de resistencias en pacientes naïve no fue realizada hasta inicios del 2007 (5). Como también reflejan estos estudios, las principales mutaciones detectadas fueron las revertientes T215 y la mutación K103N, de especial implicación clínica en regímenes de inicio ya que suelen contener Efavirenz (78).

El estudio de la distribución de subtipos no B y su asociación con factores demográficos es de una gran utilidad informativa en los ámbitos

clínicos, epidemiológicos y de estrategias de prevención de la epidemia de la infección en una región determinada. Como otros estudios indican (79, 80), su presencia en los nuevos diagnósticos en España es importante, siendo superior al 15% de casos e incrementándose en nuestro estudio durante el periodo de estudio. Las formas recombinantes supusieron 2/3 de los subtipos no B encontrados y una décima parte de todas las infecciones, siendo las formas CRF02\_AG la más prevalente, como reflejan otros estudios europeos (81, 82, 83). En España, la introducción de subtipos no B se debe principalmente a la inmigración, la mayor parte originaria de África (zona norte y subsahariana), Este de Europa y Latinoamérica. Sin embargo, en comparación con países vecino como Italia, Portugal y Francia (82, 83, 84) la prevalencia de subtipos no B en nuestro país es todavía relativamente baja. En nuestra población de estudio se observó que los pacientes infectados con subtipos no B tuvieron menos riesgo de presentar resistencias a ITIANs pero, a diferencia de otros estudios (71, 73) no encontramos diferencias al analizar por subtipo B/noB las mutaciones de resistencia a ITINANs y a IPs. Esto podría deberse a que el panel de transmisión de resistencias propuesto por Bennet en 2009 no presenta polimorfismos específicos de subtipo, especialmente en la proteasa, que otros estudios sí podrían tomarlos como mutaciones de resistencia (85).

Al analizar la influencia de otras variables sobre la presencia de TDRs, no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas en el sexo, edad, mecanismo de transmisión, país de origen, carga viral, niveles de CD4, duración de la infección, estadio CDC ni en el historial de retraso diagnóstico en ninguno de los tres estudios. Por el contrario, se observó que los pacientes con un nivel educacional bajo mostraron una mayor prevalencia de resistencia a ITINANs (OR, 7.26; 95% IC, 2.60–20.22) y a ITIANs (no estadísticamente significativo). El nivel educacional es usado como un indicador del estatus socioeconómico y de la clase social, y

estudios anteriores han mostrado la relación entre el bajo nivel educacional y el incremento de riesgo de SIDA y muerte, además de una menor respuesta virológica e inmunológica al tratamiento (75, 86). Esta relación ha sido atribuida a una pobre adherencia al tratamiento de este tipo de pacientes unido a otros factores psicosociales, que pueden permitir un aumento del riesgo de desarrollar mutaciones secundarias. Además, en la epidemia de VIH en España, los sujetos infectados en la era pre-TARGA, que recibieron monoterapia eran, principalmente, usuarios de drogas por vía parenteral con un bajo nivel educacional. Esto podría explicar una mayor circulación de cepas portadoras de mutaciones de resistencia en estratos socioeconómicos bajos. Esta hipótesis necesita ser confirmada en otros estudios posteriores, pero apunta la necesidad de incluir el nivel socioeconómico como variable en este tipo de estudios.

Nuestro estudio muestra como la prevalencia de resistencia con relevancia clínica en España durante el periodo 2007-2011 a los ARV de primera línea terapéutica es menor de lo que cabría esperar al observar la prevalencia de TDRs definidas en la lista de mutaciones de la OMS. Además se observa una tendencia significativa decreciente en la presencia de resistencia con relevancia clínica, debida principalmente a los ITINAN de primera línea Efavirenz y Nevirapina, y también a los ITIAN, Abacavir, Emtricitabina, Lamivudina y Tenofovir. Las resistencias a los IPs, Darunavir, Atazanavir y Lopinavir, se mantienen estables con una baja prevalencia durante el periodo de estudio. En contraposición a los resultados obtenidos al estudiar su tendencia, no se encontró ninguna variación en la prevalencia de las TDRs de la lista de mutaciones definida por la OMS. La resistencia a más de una clase de ARV en los nuevos pacientes incluidos en CoRIS en 2011 fue muy rara.

En nuestro estudio, la TDR fue de 7,9%, mayor que la resistencia a los ARV de primera línea. Esto implica que la resistencia efectiva a los ARV en España está por debajo de lo que cabría esperar si nos basamos en la lista de mutaciones de la OMS. De hecho, hasta el 30% de pacientes con mutaciones no presentaban resistencia, siendo este porcentaje mayor al analizar los IPs (65%) y los ITIANs (34%).

La resistencia primaria a los IPs de primera línea se mantiene por debajo del 1%, excepto en 2007. De acuerdo con lo previamente sugerido por un estudio irlandés (75), nuestro estudio apoya la hipótesis de que no es necesario desde el punto de vista clínico, realizar el estudio de resistencias en pacientes *naïve* a los IPs. Al igual que otro estudio publicado (85), nuestro estudio revela que, centrándonos únicamente en las TDR se puede sobreestimar el impacto de las resistencias circulantes sobre la eficacia clínica de los regímenes de primera línea que contienen IPs. De hecho, el 93.8% de los pacientes con TDR a IPs tan sólo poseen una mutación de resistencia en la proteasa. Para las familias de ARV con fármacos con una elevada barrera genética como los IPs, la presencia de una mutación de resistencia no debería poner en duda su uso futuro como fármaco de primera línea. Futuros estudios se hacen necesarios para evaluar el efecto clínico de estas mutaciones sobre la actividad de combinaciones de IPs en tratamientos de inicio.

Del mismo modo, también se observa este efecto en los ITIANs, con una prevalencia de TDR de 3.6% y una prevalencia de resistencia con relevancia clínica a los ARV de primera línea de 2.3%, se observa que la presencia de mutaciones aisladas (el 55% de los pacientes con TDR a ITIANs presentaron tan sólo una única mutación de resistencia). La mayoría de casos con resistencia con relevancia clínica se dieron en Zidovudina y Estavudina, dos ITIANs que ya no se incluyen como fármacos de primera

línea en la mayoría de recomendaciones internacionales para el tratamiento de primera línea. Por el contrario, Abacavir y Tenofovir son dos de los fármacos dentro de la familia de los ITIANs con un mejor porcentaje de resistencias, siendo los menos afectados por la presencia de una única mutación.

Al analizar los ITINANs, representados por los fármacos de primera línea Efavirenz y Nevirapina, dos fármacos con baja barrera genética, se observa un mayor porcentaje de resistencia que de TDR. Esta diferencia se debe, principalmente, por la categorización como resistencia intermedia de Efavirenz y/o Nevirapina con la combinación de dos o más mutaciones no incluidas en la lista de mutaciones de la OMS, o por la presencia aislada de A98G.

La evaluación de resistencias a fármacos específicos también permite valorar la barrera terapéutica global de un régimen, midiendo la robustez global a resistencias de una determinada combinación de ARV. Esto puede ser de gran importancia para evaluar la resistencia clínica a los regímenes de primera línea, para determinar recomendaciones de cómo se debe realizar los test de resistencias a los pacientes nuevos diagnósticos, y para la actualización de guías de tratamiento. En nuestro estudio, los regímenes que contenían ITINANs fueron los que mostraron la barrera genética más baja, de 5.6% a 6.2% de los pacientes nuevos diagnósticos de CoRIS, mostraron algún grado de resistencia a, al menos, algún fármaco del régimen. En contraste a estos resultados, la barrera terapéutica a los IPs de primera línea resultó ser mucho mayor, entre el 2.2% y el 2.7% mostraron algún grado de resistencia.

## 6.2 Limitaciones

Existen algunas limitaciones obvias en la realización en el estudio 1. En primer lugar, el número de pacientes incluidos por año, que podrían explicar la ausencia de diferencias significativas a lo largo del tiempo de estudio. En segundo lugar, cabe resaltar que el estudio incluye pacientes de 23 centros de 7 regiones de España con lo que no se pueden extrapolar los resultados obtenidos al total de población infectada *naïve* en España. Debido a esto, la representatividad del estudio queda limitada.

Una posible limitación del estudio 2 y 3 es que tan sólo incluye un parte de toda la población de pacientes incluida en CORIS, ya que se dispuso únicamente del 32.4% de las secuencias de RT y PR de la cohorte en el estudio 1 y el 37.8% en el estudio 2. De todos modos, solo fueron consideradas para el estudio los pacientes con secuencias de la RT y la PR a partir del 2007, año en el que fueron implementadas las recomendaciones de la realización de test de resistencias en España. Además, las características de los pacientes incluidos en el estudio son representativas de la cohorte global de pacientes.

En segundo lugar, cabe reseñar que los datos explotados a partir de la secuencia fasta, fueron obtenidos mediante la técnica de secuenciación de poblaciones, no habiéndose investigado poblaciones minoritarias. Teniendo en cuenta que el impacto de las mutaciones de resistencia minoritarias afecta principalmente a los ITINANs en pacientes *naïve*, cabe pensar que si se hubiera utilizado esta tecnología no habríamos encontrado diferencias considerables con los resultados obtenidos, sobretodo en la familia de los IPs.

Por último, desafortunadamente, no hemos podido disponer de información sobre la fecha de infección de la mayoría de los pacientes,

aunque el recuento alto de CD4, el bajo porcentaje de pacientes en estadio CDC C y el alto porcentaje de infecciones recientes en los últimos años del periodo de estudio podrían indicar una población de estudio con diagnóstico VIH temprano. El hecho de no haber encontrado una tendencia decreciente en TDRs indica que el porcentaje de población con una inclusión en CoRIS tardía sería pequeña.

Respecto al estudio de subtipos, la escasa presencia de otros subtipos no B diferentes al grupo de formas recombinantes imposibilitaron el análisis de TDR en otros subtipos no B.

### 6.3 Conclusiones

Nuestro estudio representa el más amplio estudio de epidemiología molecular de VIH en España con el fin de caracterizar la prevalencia de resistencias primarias y de subtipos no B en pacientes *naïve* durante el periodo 2004-2011. En el describimos la prevalencia de mutaciones primarias de resistencia (TDR) en la cohorte de pacientes *naïve* de la Red Española de Investigación de SIDA (CoRIS), que engloba a un gran número de centros hospitalarios participantes que abarcan una mayoría de regiones del país y que, por tanto, supone una herramienta de gran representatividad de la situación de los nuevos diagnósticos de VIH en España.

1. La prevalencia de mutaciones de resistencia primaria en España es baja, manteniéndose en torno al 8% y adecuándose a los resultados reportados en otros estudios a nivel europeo.
2. Hemos constatado una progresiva disminución en la prevalencia interanual de la transmisión de mutaciones de resistencia, desde el año 2007 hasta el 2011, principalmente causada por la disminución de la presencia de mutaciones asociadas a los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos.
3. La prevalencia de resistencias clínicamente relevantes a los antiretrovirales de primera línea recomendados en España es menor de lo inicialmente esperado en base a la transmisión de mutaciones de resistencia, haciendo necesaria la reconsideración

de coste-efectiva la realización de pruebas de resistencia a los IPs e incluso a los ITIANs.

4. La condición de bajo nivel educativo se asoció significativamente con una mayor probabilidad de presentar mutaciones de resistencia primaria. Esta variable se considera un indicador de estatus socioeconómico y cultural. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de intensificar los programas sociales de prevención en este grupo de población como factor importante para el control de la transmisión de resistencias primarias.
  
5. La presencia de subtipos no B entre los nuevos diagnósticos en España es importante aunque aún baja respecto a otros países del entorno, llegando al 15% de la población estudiada y presentando una tendencia interanual al alza en el periodo de estudio. La principal causa de este fenómeno la encontramos en la población inmigrante. Además, la aportación de CRFs es importante, ya que suponen 2/3 partes de los subtipos no B aislados y uno de cada diez nuevos diagnósticos en España son formas recombinantes.

## **Referencias bibliográficas**

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Sax, *et al.* Should resistance testing be performed for treatment-naïve HIV-infected patients? a cost-effectiveness analysis. *Clin. Infect. Dis.* 41 (9), 1316–1323.
2. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents [Internet]. Bethesda (US): Office of AIDS Research Advisory Council (OARAC) [citado 6/10/2006]. Disponible en: <http://www.aidsinfo.nih.gov/>
3. Hammer SM, *et al.* International AIDS Society–USA Panel. Treatment for adult HIV infection: 2006 recommendations of the International AIDS Society–USA Panel. *JAMA.* 2006; 296:827–43.
4. Clumeck N, *et al.* EACS Executive Committee. European AIDS Clinical Society (EACS) guidelines for the clinical management and treatment of HIV-infected adults. *HIV Med.* 2008;9:65–71.
5. Expert Committee of GESIDA and the National AIDS Plan. Recommendations of GESIDA/Spanish AIDS Plan on antiretroviral therapy in adults infected by the human immunodeficiency virus (Updated January 2007). *Enferm Infecc. Microbiol. Clin.* 2007; 25:32–53.
6. European AIDS Clinical Society (EACS) guidelines for the clinical management and treatment of HIV-infected adults [Internet]. París (FR): European AIDS Clinical Society [citado Abril 2011]. Disponible en: <http://www.europeanaidsclinicalociety.org>.
7. Panel de expertos de GESIDA; Plan Nacional sobre el Sida. Documento de consenso de GESIDA/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el

- virus de la inmunodeficiencia humana (actualización enero 2011). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 29:209.e1-209.e103.
8. Pieniazek D, *et al*. Protease sequences from HIV-1 group M subtypes A-H reveal distinct amino acid mutation patterns associated with protease resistance in protease inhibitor naive individuals worldwide. HIV Variant Working Group. *AIDS*. 2000; 14: 1489–95.
  9. Shafer RW, *et al*. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS*. 2007 Jan 11; 21(2):215-23.
  10. Bennett, D.E., *et al*. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted human immunodeficiency virus type 1 drug-resistance. 2009 update. *PLoS One* 242 4 (3), e4724.
  11. Descamps D, *et al*; ANRS AC11 Resistance Study Group.. National sentinel surveillance of transmitted drug resistance in antiretroviral-naive chronically HIV-infected patients in France over a decade: 2001-2011. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Nov;68(11):2626-31. doi: 10.1093/jac/dkt238. Epub 2013 Jun 24.
  12. Drescher SM, *et al*; Swiss HIV Cohort Study. Treatment-naive individuals are the major source of transmitted HIV-1 drug resistance in men who have sex with men in the Swiss HIV Cohort Study. *Clin Infect Dis*. 2014 Jan;58(2):285-94. doi: 10.1093/cid/cit694. Epub 2013 Oct 21.
  13. de Mendoza, C., *et al*; Seroconverter, Spanish.H.I.V., Group, Study. Resistance to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors and prevalence of human immunodeficiency virus type 1 non-B subtypes are increasing among persons with recent infection in Spain. *Clin. Infect. Dis*. 2005; 41 (9), 1350–1354.

14. Booth CL, *et al.* Prevalence and determinants of transmitted antiretroviral drug resistance in HIV-1 infection. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Jun;59(6): 1047-56. Epub 2007 Apr 19.
15. Romero A, *et al.* Recently acquired HIV infections in Spain (2003–2005). Introduction of the serological testing algorithm for recent HIV seroconversion. *Sex Transm Infect.* 2009; 85:106–10.
16. Palacios R, *et al.* Prevalence of primary resistance mutations in patients with newly diagnosed HIV infection in the province of malaga (spain). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008; 26:141–5.
17. Caro-Murillo AM, *et al.* Spanish cohort of *naïve* human immunodeficiency virus infected patients (CoRIS): rationale, organization and initial results. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2007; 25(1): 23-31.
18. Fox J, *et al*; on behalf of the UK Collaborative Group on Drug Resistance. Epidemiology of non-B clade forms of human immunodeficiency virus type 1 in men who have sex with men in the UK. *AIDS.* 2010; 24 (15): 2397-2401.
19. Galimand J, *et al.* Evidence of human immunodeficiency virus type 1 complex and second generation recombinant strains among patients infected in 1997-2007 in France: ANRS CO06 PRIMO Cohort. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2010; 26 (6): 645-651.
20. Yebra G, *et al.* Increase of transmitted drug resistance among HIV-infected sub-Saharan Africans residing in Spain in contrast to the native population. *PLoS One.* 2011; 6(10):e26757. doi: 10.1371/journal.pone.0026757. Epub 2011 Oct 25.
21. Weinstock HS, *et al.* The epidemiology of antiretroviral drug resistance among drug-naive HIV-1 infected persons in 10 US cities. *J Infect Dis* 2004; 189: 2174-80.

- 
22. L. Ruiz, *et al.* VIH Resistencia a los fármacos antirretrovirales. Guía para el manejo de las resistencias virales, de los aspectos farmacocinéticos del tratamiento y de las hepatitis virales en los pacientes infectados por VIH Resistencia a los fármacos antirretrovirales 2007.
  23. Wensing AM, *et al.* Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: Implications for clinical management. *J Infect Dis.* 2005; 192:958–66.
  24. Persaud D, *et al.*; Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1030 Team. Early archiving and predominance of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-resistant HIV-1 among recently infected infants born in the United States. *J Infect Dis.* 2007 May 15; 195(10): 1402-10.
  25. Green, H, *et al.* The Impact of Different Definitions on the Estimated Rate of Transmitted HIV Drug Resistance in the United Kingdom. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2008.
  26. Knyphausen F, *et al.* First Line Treatment Response in Patients with Transmitted HIV Drug Resistance and Well Defined Time Point of HIV Infection: Updated Results from the German HIV-1 Seroconverter Study. *PLoS One.* 2014; 9(5): e95956.
  27. Karlsson 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.
  28. Grgic I, *et al.* The Prevalence of Transmitted Drug Resistance in Newly Diagnosed HIV-Infected Individuals in Croatia: The Role of Transmission Clusters of Men Who Have Sex with Men Carrying the T215S Surveillance Drug Resistance Mutation. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2013 February; 29(2): 329–336.

- 
29. Castor D, *et al.* Transmitted Drug Resistance and Phylogenetic Relationships among Acute and Early HIV-1 Infected Individuals in New York City. *J Acquir Immune Defic Syndr.* Author manuscript; available in PMC 2013 September 1. Published in final edited form as: *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2012 September 1; 61(1): 1–8
  30. Bracciale L, *et al.* Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance in HIV-1-infected patients in Italy: evolution over 12 years and predictors. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Sep;64(3):607-15.
  31. Frenzt D, *et al.* Patterns of Transmitted HIV Drug Resistance in Europe Vary by Risk Group. *PLoS One.* 2014 Apr 10;9(4):e94495.
  32. Sagir, A, *et al.* Trends of prevalence of primary HIV drug resistance in Germany. *J Antimicrob Chemother.* 2007 60(4): 843-8.
  33. Riva C, *et al.* Transmitted HIV Type 1 drug resistance and Non-B subtypes prevalence among seroconverters and newly diagnosed patients from 1992 to 2005 in Italy. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2010
  34. Brennan CA, *et al.* Identification of human immunodeficiency virus type 1 non-B subtypes and antiretroviral drug-resistant strains in United States blood donors. *Transfusion.* 2009;49:125–133.
  35. Frange P, *et al.* New and old complex recombinant HIV-1 strains among patients with primary infection in 1996–2006 in France: the French ANRS CO06 PRIMO cohort study. *Retrovirology.* 2008; 5: 69
  36. Yebra G, *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 February; 50(2): 407–413.

- 
37. Holguín Á, *et al.* 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
  38. Vercauteren J, *et al.* Transmission of drug-resistant HIV-1 is stabilizing in Europe. *J. Infect. Dis.* 2009; 200: 1503–1508
  39. Domingo E, *et al.* RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* 1997;51:151-78.
  40. Soriano V, *et al.* Importancia clínica de la variabilidad genética del VIH. *Med Clin (Barc)* 1996;107:460-3
  41. Götte M. The distinct contributions of fitness and genetic barrier to the development of antiviral drug resistance. *Curr Opin Virol.* 2012 Oct;2(5):644-50. doi: 10.1016/j.coviro.2012.08.004. Epub 2012 Sep 8. Review.
  42. Liu TF, *et al.* Web Resources for HIV type 1 Genotypic-Resistance Test Interpretation. *Clin Infect Dis* 42(11):1608-18. Epub 2006 Apr 28
  43. Camacho R, *et al.* Algorithm for the use of genotypic HIV-1 resistance data (version Rega v9.1.0) Leuven, 08 November, 2013. Available online at <https://rega.kuleuven.be/cev/avd/software/rega-algorithm>.
  44. Guía de resistencias a los antirretrovirales 2011. Red de Investigación de SIDA. Available at [www.retic-ris.net](http://www.retic-ris.net).
  45. ANRS HIV genotypic drug resistance interpretation's algorithm. HIV French Database. September 2013 - Version n°23. Available online at <http://www.hivfrenchresistance.org>.
  46. Montaner JS, *et al.* Association of highly active antiretroviral therapy coverage, population viral load, and yearly new HIV diagnoses in

- British Columbia, Canada: a population-based study. *Lancet* 2010; 376:532-539.
47. Wood E, *et al.* Longitudinal community plasma HIV-1 RNA concentrations and incidence of HIV-1 among injecting drug users: prospective cohort study. *BMJ* 2009; 338:b1649.
  48. Alvarez M, *et al.* Improving Clinical Laboratory Efficiency: Introduction of Systems for the Diagnosis and Monitoring of HIV Infection. *Open Virol J.* 2012;6:135-43.
  49. Robertson DL, *et al.* HIV-1 nomenclature proposal. *Science.* 2000 Apr 7;288(5463):55-6.
  50. Perrin L, *et al.* Travel and the spread of HIV-1 genetic variants. *Lancet Infect Dis* 2003; 3 (1): 22-27.
  51. Peeters M, *et al.* Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials. *AIDS* 2003; 17(18): 2547-2560.
  52. Hemelaar J, *et al.*; WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterisation. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. *AIDS* 2011, 25:679
  53. Clavel F, *et al.* Virology: overview. *AIDS* 2002; 16 Suppl 4: S1-2
  54. Allen TM, *et al.* HIV-1 superinfection. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112 (5): 829-835.
  55. Koelsch KK, *et al.* Clade B HIV-1 superinfection with wild-type virus after primary infection with drug-resistant clade B virus. *AIDS* 2003; 17(7): F11-16.
  56. Smith DM, *et al.* HIV drug resistance acquired through superinfection. *AIDS* 2005; 19(12): 1251-1256.
  57. Requejo HI. Worldwide molecular epidemiology of HIV. *Rev Saude Publica* 2006; 40 (2): 331-345.

- 
58. Gilbert PB, *et al.* Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal. *Stat Med* 2003; 22 (4): 573-593.
  59. Geretti AM. HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Curr Opin Infect Dis* 2006; 19 (1): 1-7.
  60. Yamaguchi J, *et al.* HIV infections in Northwestern Cameroon: Identification of HIV type 1 group O and dual HIV type 1 group M and group O infections. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; 20: 944-957.
  61. Gascón J. Enfermedades infecciosas e inmigración. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21 (10): 535-539.
  62. Arien KK, *et al.* The replicative fitness of primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M, HIV-1 group O, and HIV-2 isolates. *J Virol* 2005; 79(14): 8979-8990.
  63. Neogi U, *et al.* Molecular epidemiology of HIV-1 subtypes in India: origin and evolutionary history of the predominant subtype C. *PLoS One*. 2012;7(6):e39819. doi: 10.1371/journal.pone.0039819. Epub 2012 Jun 29.
  64. Almeida SE, *et al.* Temporal dynamics of HIV-1 circulating subtypes in distinct exposure categories in southern Brazil. *Virol J*. 2012 Dec 12; 9:306.
  65. Hierholzer J, *et al.* Molecular epidemiology of HIV type 1 in Ecuador, Peru, Bolivia, Uruguay and Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18 (18):1339-1350.
  66. Geretti AM, *et al.* Effect of HIV-1 subtype on virologic and immunologic response to starting highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2009;48:1296-305.

- 
67. de Arellano ER, *et al.* Impact of ethnicity and HIV type 1 subtype on response to first-line antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007;23:891-4. 67
  68. Karasi JC, *et al.* High correlation between the Roche COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0 and the Abbott m2000 RealTime HIV-1 assays for quantification of viral load in HIV-1 B and non-B subtypes. *J Clin Virol*. 2011 Nov;52(3):181-6.
  69. Jagodzinski LL, *et al.* Performance characteristics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping systems in sequence-based analysis of subtypes other than HIV-1 subtype B. *J Clin Microbiol* 2003; 41 (3): 998- 1003.
  70. Kantor R, *et al.* Drug resistance in non-subtype B HIV-1. *J Clin Virol* 2004; 29 (3): 152-159.
  71. Vercauteren, J, *et al.* Transmission of drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 is stabilizing in Europe. *J. Infect. Dis.* 2009; 200 (10), 1503-1508.
  72. Wittkop, L., *et al*; for the EuroCoord-CHAIN study group. Effect of transmitted drug resistance on virological and immunological response to initial combination antiretroviral therapy for HIV (EuroCoord-CHAIN joint project): a European multicohort study. *Lancet Infect Dis*. 2011 (Article in Press DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70032-9).
  73. Bartmeyer B, *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.
  74. Audelin AM, *et al.* Molecular phylogenetics of transmitted drug resistance in newly diagnosed HIV Type 1 individuals in Denmark, a Nation-Wide Study. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011; 27: 1283–1290.

- 
75. De Gascun CF, *et al.* Documented Prevalence of HIV Type 1 Antiretroviral Transmitted Drug Resistance in Ireland from 2004 to 2008. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012; 28: 276–281.
  76. Dolling D, *et al.* Time trends in drug resistant HIV-1 infections in the United Kingdom up to 2009: multicentre observational study. *BMJ*. 2012; 345: e5253.
  77. Descamps D, *et al.* Increasing prevalence of transmitted drug resistance mutations and non-B subtype circulation in antiretroviral-naive chronically HIV-infected patients from 2001 to 2006/2007 in France. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65: 2620–2627.
  78. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in human immunodeficiency virus type 1 infected Adults and Adolescents, Department of Health and Human Services. December 1 2009; 1–168. Available at <http://aidsinfo.nih.gov>.
  79. De Mendoza C, *et al.* Changes in drug resistance patterns following the introduction of human immunodeficiency virus type 1 non-B subtypes in Spain. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2009; 25(10): 967-972.
  80. García F, *et al.* 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):150-153.
  81. Fox J, *et al*; on behalf of the UK Collaborative Group on Drug Resistance. 2010. Epidemiology of non-B clade forms of human immunodeficiency virus type 1 in men who have sex with men in the UK. *AIDS*. 24 (15): 2397-2401.
  82. Lai A, *et al.* Changing patterns in human immunodeficiency virus type 1 non-B clade prevalence and diversity in Italy over three decades. *HIV Med*. 2010; 11 (9): 593-602.

83. Palma AC, *et al.* Molecular epidemiology and prevalence of drug resistance-associated mutations in newly diagnosed human immunodeficiency virus type 1 patients in Portugal. *Infect. Genet. Evol.* 2007; 7(3): 391-398.
84. Galimand J, *et al.* Evidence of human immunodeficiency virus type 1 complex and second generation recombinant strains among patients infected in 1997-2007 in France: ANRS CO06 PRIMO Cohort. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2010; 26 (6): 645-651.
85. Frentz D, *et al.* Estimates of HIV transmitted drug resistance can be inflated due to natural sequence polymorphisms. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2011; 15; 58(5):e135-e137.(Letter).
86. Hurt CB, *et al.* Transmitted antiretroviral drug resistance among acute and recent human immunodeficiency virus infections in North Carolina from 1998 to 2007. *Antivir. Ther.* 2009; 14 (5): 673-678.

## **Anexos**

A continuación se describe el impacto de las publicaciones (JCR 2012) que incluyen los tres artículos presentados en la tesis "Transmisión de Resistencias Primarias y Subtipos no B en la Cohorte de pacientes naïve de la Red de Investigación de SIDA (CoRIS)" presentada por el doctorando Vicente Guillot Suay del Programa de Doctorado en Microbiología de la Universidad de Granada.

- Publicación 1.

Título: "Transmission of HIV drug resistance and non-B subtype distribution in the Spanish cohort of antiretroviral treatment naïve HIV-infected individuals (CoRIS)"

Revista: Antiviral Research

Ranking	Título abreviado de la revista	ISSN	Quartil	Citas totales	Factor de Impacto	Factor de impacto-5 años
693	ANTIVIR RES	0166-3542	Q1	4957	4,301	3,905

- Publicación 2.

Título: "Analysis of transmitted drug resistance in Spain in the years 2007–2010 documents a decline in mutations to the non-nucleoside drug class"

Revista: Clinical Microbiology and Infection

Ranking	Título abreviado de la revista	ISSN	Quartil	Citas totales	Factor de Impacto	Factor de impacto-5 años
1816	CLIN MICROBIOL INFECTION	1198-743X	Q1	7630	4,54	4,162

- Publicación 3

Título: "Clinically Relevant Transmitted Drug Resistance to First Line Antiretroviral Drugs and Implications for Recommendations"

Revista: Plos One

Ranking	Título abreviado de la revista	ISSN	Quartil	Citas totales	Factor de Impacto	Factor de impacto-5 años
6920	PLOS ONE	1932-6203	Q1	75544	4,092	4,537

## **Anexo I**

***Transmission of HIV drug resistance and non-B subtype distribution in the Spanish cohort of antiretroviral treatment naïve HIV-infected individuals (CoRIS).***

**(Estudio 1)**



Contents lists available at ScienceDirect

Antiviral Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/antiviral](http://www.elsevier.com/locate/antiviral)

Short communication

## Transmission of HIV drug resistance and non-B subtype distribution in the Spanish cohort of antiretroviral treatment naïve HIV-infected individuals (CoRIS)

Federico García<sup>a,\*</sup>, Santiago Pérez-Cachafeiro<sup>b</sup>, Vicente Guillot<sup>a</sup>, Marta Alvarez<sup>a</sup>, Pilar Pérez-Romero<sup>c</sup>, María Jesús Pérez-Elías<sup>d</sup>, Isabel Viciano<sup>e</sup>, Jose Ramón Blanco<sup>f</sup>, Maria López-Dieiguez<sup>g</sup>, Carmen de Mendoza<sup>h</sup>, Cohort of the Spanish AIDS Research Network (CoRIS)

<sup>a</sup> Microbiology Department, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain

<sup>b</sup> Centro Nacional de Epidemiología, CoRIS, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, Spain

<sup>d</sup> Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain

<sup>e</sup> Hospital Virgen de la Victoria, Málaga, Spain

<sup>f</sup> Hospital San Pedro-CIBIR, Logroño (La Rioja), Spain

<sup>g</sup> Hospital Clinic, Barcelona, Spain

<sup>h</sup> Hospital Carlos III, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 March 2011

Revised 22 May 2011

Accepted 23 May 2011

Available online 30 May 2011

#### Keywords:

HIV

Transmitted drug resistance

Non-B subtypes

CoRIS

### ABSTRACT

CoRIS is an open multicentre cohort of HIV seroprevalent ARV-naïve subjects who began treatment at 32 Spanish healthcare centres from January 2004. Up to November 2008, a total of 683 FASTA format sequences, encoding the HIV protease and reverse transcriptase (RT) derived from plasma samples at entry into the cohort, had been obtained for examination of transmitted drug resistance (TDR) and HIV clade. TDR was found in 8.5% of the patients (4.4% NRTIs, 4% NNRTIs, 2.2% PIs). The most prevalent resistance mutations were: T215 revertants (3.8%), D67NG (1.3%), K219QENR (1.2%) and M41L (1%), for NRTIs; K103N (3.2%), for NNRTIs; I54VLSAT, M46I and L90M (0.7%), for PIs. Non-B subtypes were recognized in 104 patients (15.2%) and were more common in Sub-Saharan Africans (15/17, 88.2%), Eastern Europeans (7/12, 58.3%) and Northern Africans (8/16, 50%) than among Spaniards (53/479, 11%) ( $p < 0.001$ ). The most prevalent non-B subtype was CRF02\_AG (4.4%), followed by subtype D (1.9%), CRF03\_AB (1.5%), CRF07\_BC and subtype F1 (1%). A trend was observed for the transmission of non-B subtypes to increase and for TDR to decrease.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

Sequence data from resistance testing offer unique opportunities to characterize the structure of HIV infection epidemics, in two ways: via the transmission of HIV drug resistance mutations (Truong et al., 2006) and via the distribution of non-B subtypes (Gifford et al., 2006). In the USA and Europe, the overall prevalence of primary drug resistance in recent years is around 10–15%, with some differences among regions and time periods (Bannister et al., 2008; Weinstock et al., 2004; Yerly et al., 2007). Two large studies, the SPREAD study (Vercauteren et al., 2009), and the Eurocord-CHAIN joint project (Wittkop et al., 2011), have consistently shown an overall prevalence of transmitted drug resistance (TDR) of around 9% across European countries. Several studies have reported the recent introduction of HIV-1 non-B subtypes into Western Europe following immigration from other regions (Fox

et al., 2010; Galimand et al., 2010; Lai et al., 2010), with a prevalence of 13–30%, depending on the country, the period and the population studied.

Genotypic testing for treatment naïve individuals was first introduced in Spain following international recommendations in 2005 (Sax et al., 2005) and nowadays is almost universal. The present study characterises the molecular epidemiology of HIV infection in Spain and the transmission of drug resistance mutations and non-B subtypes, within one of the largest HIV cohorts of seroprevalent individuals analysed in this country, that of naïve HIV infected individuals (CoRIS) (Caro-Murillo et al., 2007), and describes the trends observed over time.

CoRIS is an open, prospective, multi-centre cohort of HIV-positive subjects, aged over 13 years, who initiated care for the first time after 1 January, 2004 while naïve for antiretroviral therapy at entry. CoRIS is a joint activity administered by the Research Network of Excellence (AIDS research network, RIS). A total of 32 centres in 12 different regions in Spain participate in CoRIS. By November 2008, 3351 HIV-positive HAART-naïve patients were

\* Corresponding author. Address: Servicio de Microbiología, Hospital Universitario San Cecilio, Av. Dr. Oloriz 16, 18012 Granada, Spain. Tel./fax: +34 958 023865. E-mail addresses: [fegarcia@ugr.es](mailto:fegarcia@ugr.es), [federico.garcia.sspa@juntadeandalucia.es](mailto:federico.garcia.sspa@juntadeandalucia.es) (F. García).

included in CoRIS. For the purposes of this study (CoRIS Primary Resistance Analyses), contributing centres were asked to retrieve FASTA format sequences from routine clinical care diagnosis for the HIV drug resistance test (population sequencing), encoding the HIV protease and RT derived from plasma samples at the moment of inclusion in the cohort (baseline). A total of 18 centres in 7 regions agreed to participate and 683 FASTA sequences (38 obtained in 2004, 55 in 2005, 111 in 2006, 304 in 2007 and 175 in 2008) were sent to the coordinating centre. Transmitted Drug Resistance (TDR) associated mutations were evaluated following the surveillance drug resistance mutation list updated in 2009 (Bennett et al., 2009). The HIV subtype was ascribed using the protease gene, and phylogenetic analyses were carried out using the Therapy Edge™ (ABL, Luxembourg) subtyping tool. Molecular evolutionary analyses were conducted using the MEGA v4 program (Tamura et al., 2007), and clusters were defined considering bootstrap values >90. TDR and subtype were merged with the clinical, epidemiologic, virologic and immunologic information available from these patients in the CoRIS database for analysis. Descriptive analyses are presented using absolute numbers and percentages for categorical variables. Otherwise, the median and interquartile range is shown. All tests were two sided and a significance level of 5% was used. Chi-square tests were used to assess differences in proportions, and to reveal trends. Maentel–Haenszel crude odds ratios (OR) of association with TDR according to the HIV-subtype

were obtained. Statistical analyses were performed using Stata10® software (Texas, USA).

Table 1 describes the baseline characteristics of the study population. The prevalence of TDR during the whole study period (2004–2008) was 8.5% (95% CI: 6.6–10.8). By drug classes, the highest prevalence was found for nucleoside/tide reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) with a prevalence of 4.4% (95% CI: 3.0–6.1), followed by non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) with 4% (95% CI: 2.7–5.6) and protease inhibitors with 2.2% (95% CI: 1.3–3.5). We also recorded a calendar-year declining trend in TDR prevalence from 2004 to 2008, from 15.8% (95% CI: 6.7–30.0) in 2004 to 6.8% (95% CI: 3.8–11.4) in 2008 ( $p$  for trend = 0.09), mainly due to a decrease in the transmission rate of NRTI mutations between 2004 and 2008, from 13.2% (95% CI: 5.0–26.8) to 4% (95% CI: 1.1–6.2), respectively ( $p$  for trend = 0.04) (Table 2). As resistance testing in naïve patients was not recommended in Spanish guidelines until early 2007 (Expert Committee of GESIDA, 2007), this finding may reflect the selection of patients from higher risk groups in earlier calendar years. Ten patients (1.5%; 95% CI: 0.8–2.6) presented resistance mutations associated with resistance to two drug classes, and only two patients (0.3%; 95% CI: 0.0–1.0) presented resistance to all three drug classes evaluated. These data demonstrate that the risk of transmission of multidrug-resistant genotypes remains low in Spain.

**Table 1**  
Demographic and baseline characteristics of the study population, by year of inclusion in CoRIS.

>No.	2004		2005		2006		2007		2008		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Gender</i>												
Male	30	78.9	41	74.5	91	81.2	279	91.7	145	82.8	586	85.9
<i>Risk category</i>												
IDU	3	7.9	6	10.9	9	8.1	26	8.6	21	12	65	9.5
MSM	18	47.3	30	54.5	61	54.9	207	68.1	102	58.2	418	61.2
Heterosexual	16	42.1	17	31	40	36.1	57	18.7	50	28.6	180	26.4
Other	1	2.7	2	3.6	1	0.9	14	4.6	2	1.2	20	2.9
Median age (years)	33 (26–37.5)		35 (28–43)		36.5 (30–41)		33 (29–41)		36 (29–42.5)		34 (29–41)	
<i>Country of origin</i>												
Spain	32	84.3	43	78.2	95	85.6	183	60.2	126	72	479	70.1
Western Europe	0	0	2	3.6	2	1.8	12	3.9	0	0	17	2.5
Eastern Europe	1	2.6	1	1.8	1	0.9	4	1.3	5	2.8	12	1.8
Sub-Saharan Africa	0	0	2	3.6	1	0.9	9	3	5	2.8	17	2.5
North Africa	1	2.6	1	1.8	0	0	6	2	8	4.7	16	2.3
Latin America	3	7.9	5	9.2	12	10.8	86	28.3	26	14.9	132	19.3
Others	1	2.6	1	1.8	0	0	4	1.3	5	2.8	10	1.5
Median viral load at entry (Log copies/mL)	4.7 (4–5.1)		4.4 (3.9–4.9)		4.4 (4–5.1)		4.5 (4–5)		4.5 (3.9–5)		4.5 (4–5)	
Median CD4 counts (cells/mm <sup>3</sup> )	502 (361.5–729.9)		405 (271.5–568.5)		355 (209–602)		399 (245–618)		361 (210–571)		395 (239–616)	
Non-B subtypes	2	5.3	10	18.2	13	11.7	42	13.8	37	21.1	104	15.2

**Table 2**  
Prevalence of transmitted drug resistance during the study period.

Drug resistance	2004		2005		2006		2007		2008		Total		$p$ (trend)
	n = 38		n = 55		n = 111		n = 304		n = 175		n = 683		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Any class	6	15.8	4	7.3	8	7.2	28	9.3	12	6.8	58	8.5	0.09
NRTI	5	13.2	3	5.5	4	3.6	11	3.6	7	4	30	4.4	0.04
NNRTI	3	7.9	2	3.6	4	3.6	14	4.6	4	2.3	27	4	0.21
PI	1	2.6	1	1.8	4	3.6	6	2	3	1.7	15	2.2	0.77
Two classes											10	1.5	
Three classes											2	0.3	

**Table 3**

Prevalence of mutations proposed by the World Health Organization for surveillance of transmitted drug resistance.

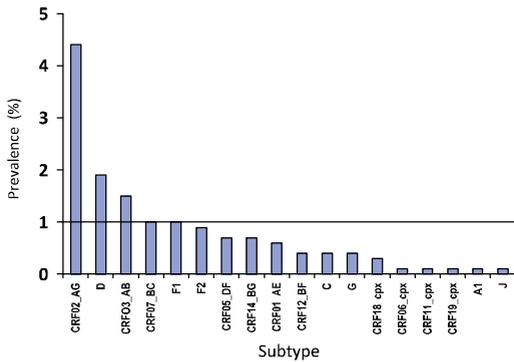
NRTI mutations			NNRTI mutations			PI mutations		
Mutation	N	(%)	Mutation	N	(%)	Mutation	N	(%)
M41L	7	(1.02)	L100I	1	(0.15)	V32I	3	(0.44)
D67NG	9	(1.32)	K101EP	4	(0.58)	M461L	7	(1.02)
T69D	1	(0.15)	K103N	22	(3.24)	I47V	2	(0.30)
K70ER	2	(0.30)	V106M	1	(0.15)	I50L	1	(0.15)
L74V	1	(0.15)	Y181C	1	(0.15)	F53L	2	(0.30)
V75M	1	(0.15)	G190A	5	(0.74)	I54LVT	5	(0.74)
Q151M	1	(0.15)			G73AS	2	(0.30)	
M184IV	3	(0.44)			L76V	1	(0.15)	
L210W	5	(0.74)			V82A	3	(0.44)	
T215Rev <sup>o</sup>	26	(3.80)			N83D	1	(0.15)	
T215F	2	(0.30)			I84V	1	(0.15)	
K219QENR	8	(1.18)			N88S	1	(0.15)	

NRTI, nucleotide reverse transcriptase inhibitors; NNRTI, non nucleotide reverse transcriptase inhibitors; PI, protease inhibitors. Amino acid abbreviations: A, alanine; C, cysteine; D, aspartate; E, glutamate; F, phenylalanine, G, glycine; H, histidine; I, isoleucine; K, lysine; L, leucine; M, methionine; N, asparagine; P, proline; Q, glutamine; R, arginine; S, serine; T, threonine; V, valine; W, tryptophan; Y, tyrosine. <sup>o</sup>=C/D/E/N/I/V/S.

(0.11–7.14); Sub-Saharan Africa, 0.62 (0.08–4.78); North Africa, 1.41 (0.31–6.43); Latin America, 0.72 (0.34–1.52);  $p = 0.88$  vs Spanish]; age, viral load or median CD4 count at entry. As in other European studies (Vercauteren et al., 2009; Wittkop et al., 2011), T215 Revertants (3.8%; 95% CI: 2.6–3.5) and K103 N (3.2%; 95%CI: 2.1–4.8) were the most prevalent mutations responsible for NRTI and NNRTI resistance, respectively. In Spain, where efavirenz is one of the drugs most widely used as first-line therapy, the presence of K103N represents a problem for first-line antiretroviral therapy. Therefore, in accordance with current treatment guidelines (doi:10.1016/j.eimc.2010.12.0004), primary resistance testing is mandatory before initiating first-line therapy. Other prevalent mutations (Table 3) found in our study were the thymidine-associated mutations (TAMs) D67NG, (1.3%; 95% CI: 0.6–2.4); K219QENR (1.18%; 95% CI: 0.5–2.2) and M41L, (1.02%; 95% CI: 0.4–2.0). For PIs, no individual mutation associated with TDR was detected at a level exceeding 1%.

The distribution of non-B subtypes and their association with demographic factors, over the course of the HIV epidemic in a region, provide useful information in terms of clinical, epidemiologic and prevention strategies. In our study, subtype B accounted for 84.8% (95% CI: 81.9–87.3) of HIV-1 infections in CoRIS, and 104 patients (15.2%; 95% CI: 12.7–18.1) harboured non-B strains. CRF02\_AG was the most prevalent non-B (4.4%, 95% CI: 3.0–6.1), followed by subtype D (1.9%; 95% CI: 1.1–3.2), CRF03\_AB (1.5%; 95% CI: 0.7–2.6), CRF07\_BC and subtype F1 (1%; 95% CI: 0.4–2.0); other subtypes included subtype F2 (0.9%; 95% CI: 0.4–1.8), CRF05\_DF & CRF14\_BG (0.7; 95% CI: 0.3–1.6), CRF01\_AE (0.6%; 95% CI: 0.2–1.4), CRF12\_BF, subtype C, and subtype G (0.4; 95% CI: 0.1–1.2), CRF18\_cpx (0.3; 95% CI: 0.1–1.0), CRF06\_cpx, CRF11\_cpx, CRF19\_cpx, A1 subtype A1, and subtype J (0.1%; CI95: 0.0–0.7) (Fig. 1). As other authors have reported (de Mendoza et al., 2005) non-B subtypes are noticeably present in newly-diagnosed patients in Spain, constituting over 15% during the study period and 21% in 2008.

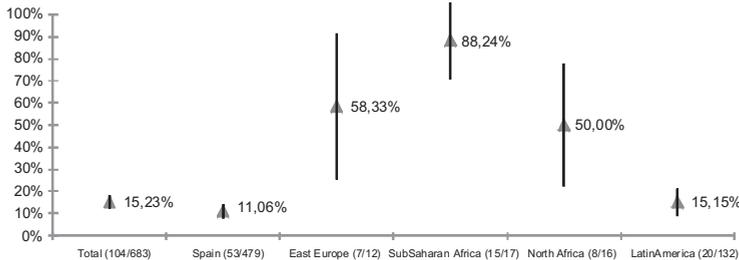
In Western Europe the increase in non-B subtypes is related mainly to immigration (Yerly et al., 2007). Thus, in our study the patients from Sub-Saharan Africa (15/17, 88.2%), Eastern Europe (7/12, 58.3%) and North Africa (8/16, 50%) showed a higher prevalence of non-B subtypes than did Spaniards (53/479, 11%,  $p < 0.01$ ), (Fig. 2). Circulating recombinant forms (CRFs) accounted for 2/3 of non-B subtypes (66.3%; 95% CI: 56.9–75.0) and for 1/10 (10.1%; 95% CI: 8.0–10.5) of all the patients studied. As for all non-B subtypes, CRFs were more prevalent in Sub-Saharan Africans (64.7%; 95% CI: 40.5–84.3), North Africans (37.5%; 95% CI: 16.8–62.4) and Eastern Europeans (33.3%; 95% CI: 11.6–62.3) than among Spaniards (6.9%; 95% CI: 4.9–9.4) or Latin Americans (7.5%; 95% CI: 4.2–12.5). An increase in the prevalence of non-B subtypes



Non B subtypes were detected in 104 patients (15.2%)

**Fig. 1.** Non-B subtype distribution in CoRIS.

No association was observed between TDR and gender [OR for TDR 0.53 (0.27–1.03),  $p = 0.06$ ]; risk category for HIV infection [Intravenous Drug Users, 0.6 (0.2–1.87); Men who have sex with men, 0.82 (0.45–1.49),  $p = 0.74$  vs heterosexuals-HTX]; country of origin [Western Europe, 0.66 (0.08–5.12); Eastern Europe, 0.9



$p < 0.001$  (Chi square) Sub-Saharan Africans, Eastern Europeans and North Africans vs Spaniards and  $p = 0.086$  vs Latin Americans. Vertical bars represent 95%CI.

**Fig. 2.** Prevalence of non-B subtypes by geographical origin in CoRIS.

was observed during the study period, from 5.4% (95% CI: 0.9–16.3) in 2004 to 21% (95% CI: 15.6–27.7) in 2008 ( $p$  for trend <0.05). However, compared with our neighbouring countries, France (Galimand et al., 2010), Italy (Lai et al., 2010) and Portugal (Palma et al., 2007), where non-B subtypes in newly diagnosed patients may account for 30%, the proportion of non-B subtypes in Spain seems to be low.

TDR was no higher for non-B subtype than for B subtype infected patients in CoRIS. Resistance mutations were detected in 8.6% (CI 95: 4.3–15.3) of the non-Bs [OR for TDR 1.18 (0.57–2.41),  $p = 0.65$ ]. This was also true for CRF02\_AG and subtype D, the most prevalent non-B subtypes in our cohort. These data are in contrast to those of Vercauteren et al., 2009, who found that infection with a B subtype was the strongest predictor for TDR. Different study periods and different populations may account for the differences, and thus there is a need for further studies to evaluate TDR and subtypes.

Among recent HIV infections, clusters ranging from 2 to 25 or more members are frequently identified (Ragonnet-Cronin et al., 2010; Recordon-Pinson et al., 2009). The segregation into clusters suggests the existence of forward transmission events and has implications for the presence of drug resistance mutations and non-B subtypes in the newly-infected population. However, in our study only two clusters, involving 5 patients with TDR, were found.

There are some obvious limitations to our study. First, the number of patients included per year, which may explain why we found no significant differences over time. Second, as we studied 683 patients from 18 healthcare centres in 7 Spanish regions, the population studied was not always representative of the whole Spanish HIV-infected population. Nevertheless, this is the largest survey of TDR and HIV subtypes conducted so far in Spain.

In conclusion, this paper describes the largest Spanish survey to date to address HIV molecular epidemiology in antiretroviral naive patients during 2004–2008, and we present the first Spanish report in this respect following international guidelines. The prevalence of non-B subtypes, with a high representation of recombinants, was relatively high in 2008, mainly due to the impact of the immigrant population. These observations may have important implications for the epidemiological point of view and for the clinical management of HIV-infected patients in Spain.

## Funding

This work was funded in part by grants from Red de Investigación en SIDA (RIS, ISCIII-RETIC-RD06), Fondo de Investigación Sanitaria-FIS (CP06/0284, CP07/0207), and Junta de Andalucía-SAS (PI08/0408 & PI-0123/2010).

## Transparency declarations

None to declare.

## References

- Bannister, W.P., Cozzi-Lepri, A., Clotet, B., Mocroft, A., Kjaer, J., Reiss, P., von Wyl, V., Lazzarin, A., Katlama, C., Phillips, A.N., Ruiz, L., Lundgren, J.D., 2008. EuroSIDA study group, transmitted drug resistant human immunodeficiency virus type 1 and association with virological and CD4 cell count response to combination antiretroviral therapy in the EuroSIDA study. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 48 (3), 324–333.
- Bennett, D.E., Camacho, R.J., Otelea, D., Kuritzkes, D.R., Fleury, H., Kiuchi, M., Heneine, W., Kantor, R., Jordan, M.R., Schapiro, J.M., Vandamme, A.M., Sandstrom, P., Boucher, C.A., van de Vijver, D., Rhee, S.Y., Liu, T.F., Pillay, D., Shafer, R.W., 2009. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted human immunodeficiency virus type 1 drug-resistance. 2009 update. *PLoS One* 4 (3), e4724.
- Caro-Murillo, A.M., Castilla, J., Pérez-Hoyos, S., Miró, J.M., Podzamczec, D., Rubio, R., Riera, M., Viciana, P., López Aldeguer, J., Iribarren, J.A., de los Santos-Gil, I.,

- Gómez-Sirvent, J.L., Berenguer, J., Gutiérrez, F., Saumoy, M., Segura, F., Soriano, V., Peña, A., Pulido, F., Oteo, J.A., Leal, M., Casabona, J., del Amo, J., Moreno, S., 2007. Grupo de trabajo de la Cohorte de la Red de Investigación en Sida (CoRIS). Spanish cohort of naïve human immunodeficiency virus infected patients (CoRIS): rationale, organization and initial results. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 25 (1), 23–31.
- de Mendoza, C., Rodríguez, C., Colomina, J., Tuset, C., García, F., Eiros, J.M., Corral, A., Leiva, P., Aguero, J., Torre-Cisneros, J., Pedreira, J., Viciana, I., del Romero, J., Saez, A., Ortiz de Lejarazu, R., Soriano, V., Seroconverter, Spanish.H.I.V., Group, Study., 2005. Resistance to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors and prevalence of human immunodeficiency virus type 1 non-B subtypes are increasing among persons with recent infection in Spain. *Clin. Infect. Dis.* 41 (9), 1350–1354.
- Expert Committee of GESIDA and the National AIDS Plan. Recommendations of GESIDA/Spanish AIDS Plan on antiretroviral therapy in adults infected by the human immunodeficiency virus (Updated January 2007). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2007; 25:32–53.
- Fox, J., Castro, H., Kaye, S., McClure, M., Weber, J., Fidler, S. On behalf of the UK Collaborative Group on Drug Resistance, 2010. Epidemiology of non-B clade forms of human immunodeficiency virus type 1 in men who have sex with men in the UK. *AIDS* 24 (15), 2397–2401 [Epub ahead of print].
- Galimand, J., Frange, P., Rouzioux, C., Deveau, C., Avettand-Fenoël, V., Ghosn, J., Lascoux, C., Goujard, C., Meyer, L., Chaix, M.L., 2010. Evidence of human immunodeficiency virus type 1 complex and second generation recombinant strains among patients infected in 1997–2007 in France. ANRS CO06 PRIMO Cohort. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 26 (6), 645–651.
- Gifford, R., de Oliveira, T., Rambaut, A., Myers, R.E., Gale, C.V., Dunn, D., Shafer, R., Vandamme, A.M., Kellam, P., Pillay, D.U.K Collaborative Group on HIV Drug Resistance, 2006. Assessment of automated genotyping protocols as tools for surveillance of human immunodeficiency virus type 1 genetic diversity. *AIDS* 20 (11), 1521–1529.
- Lai, A., Riva, C., Marconi, A., Balestrieri, M., Razzolini, F., Meini, G., Vicenti, I., Rosi, A., Saladini, F., Caramma, I., Franzetti, M., Rossini, V., Galli, M., Violin, M., Zazzi, M., Balotta, C., 2010. Changing patterns in human immunodeficiency virus type 1 non-B clade prevalence and diversity in Italy over three decades. *HIV Med.* 11 (9), 593–602 [Epub ahead of print].
- Palma, A.C., Araujo, F., Duque, V., Borges, F., Paixao, M., Camacho, R., Network, Portuguese Spread., 2007. Molecular epidemiology and prevalence of drug resistance-associated mutations in newly diagnosed human immunodeficiency virus type 1 patients in Portugal. *Infect. Genet. Evol.* 7 (3), 391–398.
- Ragonnet-Cronin, M., Ofner-Apostolini, M., Merks, H., Pilon, R., Rekart, M., Archibald, C.P., Sandstrom, P.A., Brooks, J.L., 2010. Longitudinal phylogenetic surveillance identifies distinct patterns of cluster dynamics. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 55 (1), 102–108 [Epub ahead of print].
- Recordon-Pinson, P., Anies, G., Bruyand, M., Neau, D., Morlat, P., Pellegrin, J.L., Groppi, A., Thiébaud, R., Dabis, F., Fleury, H., Masquelier, B., RS, A.N.CO3 Aquitaine Cohort, 2009. Human immunodeficiency virus type 1 transmission dynamics in recent seroconverters: relationship with transmission of drug resistance and viral diversity. *Antivir. Ther.* 14 (4), 551–556.
- Sax, P., Islam, R., Walensky, R., Losina, E., Weinstein, M., Goldie, S., Sadownik, S., Freedberg, A., 2005. Should resistance testing be performed for treatment-naïve HIV-infected patients? a cost-effectiveness analysis. *Clin. Infect. Dis.* 41 (9), 1316–1323. doi:10.1086/49698.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) Software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24 (8), 1596–1599.
- Truong, H.M., Grant, R.M., McFarland, W., Kellogg, T., Kent, C., Louie, B., Wong, E., Klausner, J.D., 2006. Routine surveillance for the detection of acute and recent human immunodeficiency virus infections and transmission of antiretroviral resistance. *AIDS* 20 (17), 2193–2197.
- Vercauteren, J., Wensing, A.M., van de Vijver, D.A., Albert, J., Balotta, C., Hamouda, O., Kücherer, C., Struck, D., Schmit, J.C., Asjö, B., Bruckova, M., Camacho, R.J., Clotet, B., Coughlan, S., Grossman, Z., Horban, A., Korn, K., Kostrikis, L., Nielsen, C., Paraskevis, D., Poljak, M., Puchhammer-Stöckl, E., Riva, C., Ruiz, L., Salminen, M., Schuurman, R., Sonnerborg, A., Stanekova, D., Stanojevic, M., Vandamme, A.M., Boucher, C.A., 2009. Transmission of drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 is stabilizing in Europe. *J. Infect. Dis.* 200 (10), 1503–1508.
- Weinstock, H.S., Zaidi, I., Heneine, W., Bennett, D., Garcia-Lerma, J.G., Douglas Jr, J.M., LaLota, M., Dickinson, G., Schwarcz, S., Torian, L., Wendell, D., Paul, S., Goza, G.A., Ruiz, J., Boyett, B., Kaplan, J.E., 2004. The epidemiology of antiretroviral drug resistance among drug-naïve human immunodeficiency virus type 1 infected persons in 10 US cities. *J. Infect. Dis.* 189 (12), 2174–2180.
- Wittkop, L., Günthard, H., de Wolf, F., Dunn, D., Cozzi-Lepri, A., de Luca, A., Kücherer, C., Obel, N., von Wyl, V., Masquelier, B., Stephan, C., Torti, C., Antinori, A., García, F., Judd, A., Porter, K., Thiébaud, R., Castro, H., van Sighem, A., Colin, C., Kjaer, J., Lundgren, J., Paredes, R., Pozniak, A., Clotet, B., Phillips, A., Pillay, D., Chêne, G., for the EuroCoord-CHAIN study group, 2011. Effect of transmitted drug resistance on virological and immunological response to initial combination antiretroviral therapy for HIV (EuroCoord-CHAIN joint project): a European multicohort study. *Lancet Infect Dis* (Article in Press DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70032-9).
- Yerly, S., von Wyl, V., Ledergerber, B., Böni, J., Schüpbach, J., Bürgisser, P., Klimkait, T., Rickenbach, M., Kaiser, L., Günthard, H.F., Perrin, L. Swiss HIV Cohort Study, 2007. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance in Switzerland: a 10-year molecular epidemiology survey. *AIDS* 21 (16), 2223–2229.

## **Anexo II**

***Analysis of transmitted drug resistance in Spain in the years  
2007-2010 documents a decline in mutations to the non-  
nucleoside drug class.***

**(Estudio 2)**

## Analysis of transmitted drug resistance in Spain in the years 2007–2010 documents a decline in mutations to the non-nucleoside drug class

S. Monge<sup>1</sup>, V. Guillot<sup>2</sup>, M. Alvarez<sup>2</sup>, A. Peña<sup>2</sup>, P. Viciano<sup>3</sup>, S. García-Bujalance<sup>4</sup>, M. J. Pérez Elias<sup>5</sup>, J. A. Iribarren<sup>6</sup>, F. Gutiérrez<sup>7</sup>, M. Itziar Casado<sup>8</sup> and F. García; CoRIS\*

1) Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España, 2) Servicio de Microbiología, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, España, 3) Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, España, 4) Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital La Paz, Madrid, España, 5) Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España, 6) Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián, España, 7) Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario de Elche, Elche, España and 8) Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital de Navarra, Pamplona, España

### Abstract

We have studied transmitted drug resistance (TDR) in 1.864 antiretroviral-naïve patients entering CoRIS (Spain) during 2007–2010. An overall 8.58% TDR was observed (3.92%, nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs); 3.86%, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs); 2.31%, protease inhibitors), with a significant decreasing trend over time for NNRTIs (5.53%, 2007; 2.45%, 2010;  $p$  for trend = 0.044). Non-B subtype prevalence was 15.93%, with a significant increase (11.95%, 2007; 18.14%, 2010;  $p$  for trend = 0.018), mainly related to immigration. Having no formal education increased the risk of TDR to NNRTIs (OR, 7.26), and carrying a non-B subtype reduced the risk of TDR to NRTIs (OR, 0.27). These findings may have important implications for treatment guidelines and laboratory testing recommendations.

**Keywords:** CoRIS, HIV, non-B subtypes, transmitted drug resistance

**Original Submission:** 1 May 2012; **Revised Submission:** 14 August 2012; **Accepted:** 15 August 2012

Editor: G. Antonelli

**Article published online:** 31 August 2012

*Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: E485–E490

10.1111/1469-0691.12011

**Corresponding author:** F. García, Microbiology Service, Hospital Universitario San Cecilio, Av. Dr. Oloriz, Granada, Spain  
E-mail: fe Garcia@ugr.es

\*Members of the CoRIS are listed in Appendix I.

### Introduction

CoRIS is an open, multicentre, prospective cohort of HIV-positive, antiretroviral-naïve subjects over 13 years old that offers relevant information about the current epidemiological profile of HIV infection in Spain [1]. A previous analysis of viral sequences in CoRIS was carried out in 2008 and has been published elsewhere [2]. However, since a national recommendation to perform HIV resistance testing to every patient upon HIV diagnosis [3] was issued in 2007, we expected this period to be more representative of both transmitted drug resistance (TDR) and non-B subtypes. In this report we describe TDR and non-B subtypes in CoRIS from 2007 to 2010, and we evaluate their association with clinical and sociodemographical variables.

Resistance-associated mutations were evaluated following the 2009 WHO surveillance list [4]. HIV subtype was ascribed using the protease gene with the Therapy Edge™ (ABL, Luxembourg) subtyping tool. Prevalence of TDR and non-B viral subtypes and its trend over time was assessed (chi-square test). Multiple logistic regression was used to analyze their association with variables at sampling dates  $\pm 2$  months (CD4 count and viral load; duration of infection; CDC stage; history of delayed diagnosis (CD4 < 350 cells/mm<sup>3</sup>); sex; age; transmission category; educational level; and country of origin).

From 2007 to 2010 a FASTA sequence was obtained for 1.864 patients, with a median time from cohort entry to resistance study of 0 days (IQR, –21–15). A description of the study population by year is shown in Table 1. A total of 160 patients (8.58% (95% CI, 7.31–9.86)) had at least one mutation that conferred resistance to antiretroviral drugs (ARV). A similar prevalence was found for nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) (3.92% (95% CI, 3.03–4.80) and 3.86% (95% CI, 2.99–4.74), respectively). Resistance to protease inhibitors (PIs) was less prevalent, of 2.31% (95% CI, 1.62–2.99). TDRs to two and three classes of ARV were uncommon (1.18% (95% CI, 0.69–1.67) and 0.16% (95% CI, –0.02–0.34), respectively), and did not change over time. As in previous studies [5–7], T215 revertants and K103N were the most prevalent mutations (Table 2).

A significant decreasing trend was found for resistance to NNRTIs, from 5.53% (95% CI, 3.42–7.65) in 2007 to 2.45%

**TABLE 1. Baseline characteristics of the study population**

	2007	2008	2009	2010	Full period	
	452	506	498	408	1864	
	n (%)	p				
Sex						
Male	407 (90.0)	414 (81.8)	442 (88.8)	365 (89.5)	1628 (87.34)	<0.01
Female	45 (10.0)	92 (18.2)	56 (11.2)	43 (10.5)	236 (12.7)	
Median age (IQR) <sup>a</sup>	34.1 (28.2–41.9)	34.3 (28.6–41.1)	33.0 (27.9–39.7)	34.0 (28.3–40.2)	33.9 (28.3–40.6)	0.17
Mode of transmission						
IDU	32 (7.1)	43 (8.5)	22 (4.4)	21 (5.2)	118 (6.3)	<0.01
MSM	303 (67.0)	301 (59.5)	371 (74.5)	307 (75.2)	1282 (68.8)	
Heterosexual	110 (24.3)	152 (30.0)	96 (19.3)	67 (16.4)	425 (22.8)	
Other/NA	7 (1.6)	10 (2.0)	9 (1.8)	13 (3.2)	39 (2.1)	
Country of origin						
Spain	307 (67.9)	356 (70.4)	366 (73.5)	269 (65.9)	1298 (69.6)	0.29
Europe (other)	20 (4.4)	28 (5.5)	21 (4.2)	24 (5.9)	93 (5.0)	
Africa	21 (4.7)	20 (4.0)	21 (4.2)	12 (2.9)	74 (4.0)	
Latin America	100 (22.1)	96 (19.0)	86 (17.3)	101 (24.8)	383 (20.5)	
Other/unknown	4 (0.9)	6 (1.2)	4 (0.8)	2 (0.5)	16 (0.9)	
Educational level						
Higher education	107 (23.7)	131 (25.9)	153 (30.7)	131 (32.1)	522 (28.0)	<0.01
Secondary school	165 (36.5)	167 (33.0)	169 (33.9)	140 (34.3)	641 (34.4)	
Primary school	107 (23.7)	141 (27.9)	97 (19.5)	94 (23.0)	439 (23.6)	
No studies	13 (2.9)	13 (2.6)	17 (3.4)	2 (0.5)	45 (2.4)	
Unknown	60 (13.3)	54 (10.7)	62 (12.5)	41 (10.1)	217 (11.6)	
Viral load (log copies/mL) <sup>a</sup>						
n	288	352	353	300	1293	0.38
Median (IQR)	4.6 (4.1–5.1)	4.5 (4.0–5.0)	4.6 (4.1–5.1)	4.6 (4.1–5.1)	4.6 (4.0–5.1)	
CD4 count (cells/mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>						
n	357	411	397	350	1515	0.08
Median (IQR)	375 (223–567)	363 (226–545)	394 (251–591)	398.5 (245–580)	383 (235–567)	
Duration of the infection <sup>b</sup>						
Recent infection	42 (9.3)	44 (8.7)	50 (10.0)	37 (9.1)	173 (9.3)	0.72
Chronic infection	110 (24.3)	105 (20.8)	111 (22.3)	102 (25.0)	428 (23.0)	
Not evaluable	300 (66.4)	357 (70.6)	337 (67.7)	269 (65.9)	1263 (67.8)	
CDC stage <sup>a</sup>						
A	377 (83.4)	432 (85.4)	450 (90.4)	365 (89.5)	1624 (87.1)	0.01
B	40 (8.9)	31 (6.1)	22 (4.4)	22 (5.4)	115 (6.2)	
C	35 (7.7)	43 (8.5)	26 (5.2)	21 (5.2)	125 (6.7)	
History of delayed diagnosis						
Yes	135 (29.9)	178 (35.2)	134 (26.9)	112 (27.5)	559 (30.0)	0.05
No	229 (50.7)	240 (47.4)	271 (54.4)	230 (56.4)	970 (52.0)	
Not evaluable	88 (19.5)	88 (17.4)	93 (18.7)	66 (16.2)	335 (18.0)	

NA, not available; IQR, interquartile range.

<sup>a</sup>At the time of the resistance testing; IDU, injecting drug users; MSM, men who have sex with men.

(95% CI, 0.94–3.96) in 2010 ( $p$  for trend = 0.044). This explained a slight non-significant decreasing trend for global TDR ( $p$  for trend = 0.095), while no trend was found for NRTIs or PIs (Fig. 1). The decrease shown in overall TDR, together with the very low detection of TDR to more than one ARV class may have important implications for treatment guideline recommendations in the future [8]. As a recent study in Ireland discusses [9], our study may support the hypothesis that there may be no need to screen for PI resistance, and that a NNRTI-only approach could be more cost-effective, though these data need to be confirmed in the light of the low prevalence to NNRTIs found in Spain in 2010.

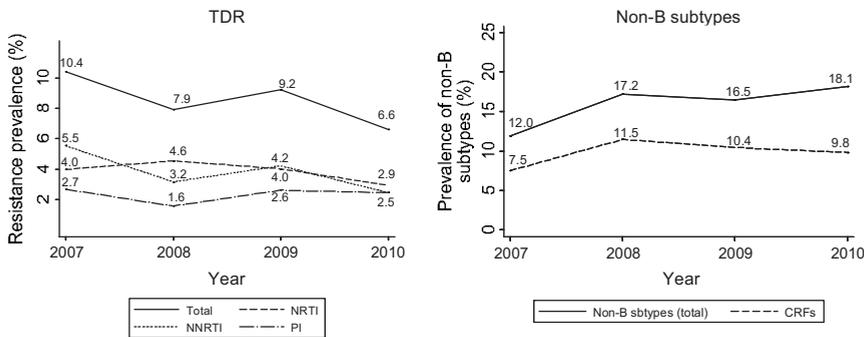
Regarding associated variables, there was a non-statistically significant higher risk of TDR to NRTIs and NNRTIs during

the recent infection phase. Having no formal education increased the risk of resistance to NNRTIs (OR, 7.26; 95% CI, 2.60–20.22) and to NRTIs (non-statistically significant), compared with having achieved higher education. We hypothesize two factors that could explain a higher circulation of strains carrying mutations within low socioeconomic strata. Educational level has been previously associated with a poorer virological and immunological response to treatment [10], possibly explained by worse adherence to treatment and increased risk of secondary mutations. Also, subjects from the pre-HAART era in Spain, who may have been exposed to mono-therapy, were predominantly injecting drug users of low educational level. These results point out the importance of including socioeconomic variables in TDR studies.

**TABLE 2.** Prevalence of mutations from the WHO transmitted drug resistance surveillance list

NRTI mutations		NNRTI mutations		PI mutations	
Mutation	n (%)	Mutation	n (%)	Mutation	n (%)
M41L	21 (1.13)	L100I	3 (0.16)	L24I	1 (0.05)
K65R	1 (0.05)	K103N/S	59 (3.17)	D30N	1 (0.05)
D67EGN	17 (0.91)	V106AM	0 (0.00)	V32I	3 (0.16)
T69D	3 (0.16)	Y181CIV	7 (0.38)	M46IL	12 (0.64)
K70ER	5 (0.27)	Y188CHL	3 (0.16)	I47AV	3 (0.16)
L74IV	4 (0.21)	G190AES	8 (0.43)	I50LV	1 (0.05)
F77L	1 (0.05)	P225H	1 (0.05)	F53LY	4 (0.21)
Y115F	2 (0.11)			I54ALMSTV	6 (0.32)
M184IV	9 (0.48)			G73ACST	1 (0.05)
L210W	2 (0.11)			L76V	1 (0.05)
T215REV <sup>A</sup>	25 (1.34)			V82ACFLMST	6 (0.32)
T215YF	2 (0.10)			N83D	1 (0.05)
K219EQNR	22 (1.18)			I84ACV	0 (0.00)
TAMS	69 (3.70)			I85V	2 (0.11)
1 mut.	42 (2.25)	1 mut.	61 (3.27)	N88DS	4 (0.21)
2 mut.	25 (1.32)	2 mut.	11 (0.59)	L90M	13 (0.70)
>3 mut.	6 (0.32)	>3 mut.	0 (0.00)	1 mut.	36 (1.93)
Prevalence [95%CI]	73 (3.92) [3.03–4.80]	Prevalence [95%CI]	72 (3.86) [2.99–4.74]	2 mut.	2 (0.11)
				>3 mut.	5 (0.26)
				Prevalence [95%CI]	43 (2.31) [1.62–2.99]

NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors; PI, protease inhibitors; TAMS, thymidine associated mutations. Amino acid abbreviations: A, alanine; C, cysteine; D, aspartate; E, glutamate; F, phenylalanine; G, glycine; H, histidine; I, isoleucine; K, lysine; L, leucine; M methionine; N, asparagine; P, proline; Q, glutamine; R, arginine; S, serine; T, threonine; V, valine; W, tryptophan; Y, tyrosine.  
<sup>A</sup>C/D/E/N/I/V/S.



**FIG. 1.** Prevalence of TDR by antiretroviral family and non-B subtypes between 2007 and 2010. NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors; PI, protease inhibitors. CRFs, circulating recombinant forms. A significant decreasing trend was found for resistance to NNRTIs ( $p$  for trend = 0.044).

Non-B subtypes are clearly represented in newly diagnosed patients in Spain; 297 subjects had a non-B subtype, giving a prevalence of 15.93% (95% CI, 14.27–17.60). Interestingly, the proportion of non-B infections increased along the study period, from 11.95% (95% CI, 8.95–14.95) in 2007 to 18.14% (95% CI, 14.38–21.89) in 2010 ( $p$  for trend = 0.018). Circulating recombinant forms (CRFs) accounted for two-thirds of non-Bs (61.95% ( $n$  = 184)), and constituted 9.87% of all HIV infections. The most prevalent subtypes were CRF02\_AG (4.24%; 95% CI, 3.32–5.15), subtype FI (1.61%; 95% CI, 1.04–2.18), subtype D (1.50%; 95% CI, 0.95–2.05), subtype G (1.07%; 95% CI, 0.60–1.54) and CRF12\_BF (1.07%; 95% CI, 0.60–1.54).

As in Western Europe [6,9,11–15], in Spain the increase in non-Bs is related mainly to immigration, as non-B subtypes were more common in people of non-Spanish origin. Nearly 12% of HIV-infected native Spaniards carried a non-B variant (11.79%; 95%CI: 10.03–13.54), and prevalence was higher for people originating from Africa (sub-Saharan (81.77%; 95% CI, 69.69–91.85) and northern (36.36%; 95% CI, 14.53–58.19)), Eastern Europe (27.96%; 95% CI, 18.66–37.25) and Latin-America (17.23%; 95% CI, 13.43–21.03). Subjects infected through heterosexual sex also showed an increased risk of non-B subtypes (OR, 1.84; 95% CI, 0.99–3.43;  $p$  = 0.053). Patients infected by a non-B subtype were at a 73% lower risk (OR, 0.27; 95% CI, 0.09–0.80) of having resistance to

the NRTI class than those with a B subtype. In contrast to other studies [15–17], we did not find any differences in TDR to NNRTIs or PIs; of note, the panel of resistance mutations associated with TDR proposed by Bennett *et al.* [4] does not include clade-specific polymorphisms, especially in the protease, that other studies may consider as resistance mutations [18].

In summary, we have described the trends in TDR and subtype introduction in Spain in the years 2007–2010. A decline in TDR has been documented, reaching a statistically significant decrease for TDR to the NNRTI class, a finding that may influence treatment and laboratory testing recommendations. Our study has also identified the association between having TDR and low educational level, a proxy for socio-economic status. The risk of transmission of multidrug-resistant genotypes remains low in Spain. Finally, this study confirms a significant increase in non-B subtype infections from 2007 to 2010 and its association with a foreign origin.

## Transparency Declaration

Vicente Guillot, Marta Alvarez, Alejandro Peña, Silvia García-Bujalance, Jose Antonio Iribarren, Marina Itziar Casado: These authors declare no conflicts of interest.

Susana Monge has received research funding from the FIS (Spanish Health Research Fund) and is (was) not an employee of any of this organisation(s).

Pompeyo Viciano has received funds for speaking, consultancy, advisory board membership or travel from Abbott, Boehringer Ingelheim, Bristol Myers Squibb, Gilead, Glaxo Smithkline, Janssen, Merck, Pfizer, Roche, and ViiV Healthcare laboratories. Pompeyo Viciano has received research funding from Andalusian Health Service, Spanish AIDS Research Network (RETICS-RIS), and is (was) not an employee of any of this organisation(s).

M<sup>a</sup> Jesús Pérez Elías has received funds for speaking, consultancy, advisory board membership or travel from ViiF, BMS, BH, MSD, Janssen-Cilag, Gilead, and Abbott. M<sup>a</sup> Jesús Pérez Elías has received research funding from ViiF, Janssen-Cilag, Gilead.

Félix Gutiérrez has received research funding, consultancy fees, or lecture sponsorships from, or has served on advisory boards for Abbott, Boehringer-Ingelheim, Bristol-Myers Squibb, Gilead Sciences, GlaxoSmith-Kline, Janssen-Cilag, Merck Sharp & Dohme, Pfizer, and ViiV Healthcare.

Federico García has received funds for speaking, consultancy, advisory board membership or travel from ViiV Healthcare, Abbott, Merck & Roche. Federico García has received research funding from Red Temática Cooperativa

de Investigación en SIDA (ISCIIRETIC0006/0016), Ministerio de Sanidad (EC11-001), Junta de Andalucía (SAS 111 212 & SA 047) and is (was) not an employee of any of this organisation(s).

## Appendix I

### CoRIS Resistance Group

**Steering Committee:** Juan Berenguer, Julia del Amo, Federico García, Félix Gutiérrez, Pablo Labarga, Santiago Moreno y María Ángeles Muñoz.

**Data analysis:** Paz Sobrino Vegas, Victoria Hernando Sebastián, Belén Alejos Ferreras, Débora Álvarez, Susana Monge, Inma Jarrín, Santiago Pérez Cachafeiro.

**BioBank:** M<sup>a</sup> Ángeles Muñoz-Fernández, Isabel García-Merino, Coral Gómez Rico, Jorge Gallego de la Fuente y Almudena García Torre.

### Participants

Hospital Universitario de Canarias (Santa Cruz de Tenerife): Juan Luis Gómez Sirvent, Patricia Rodríguez Fortúnez, María Remedios Alemán Valls, María del Mar Alonso Socas, María Inmaculada Hernández Hernández, Felicitas Díaz-Flores, Dácil García Rosado y Ricardo Pelazas González.

Hospital Carlos III (Madrid): Vicente Soriano, Pablo Labarga, Pablo Barreiro, Francisco Blanco, Luz Martín Carbonero, Eugenia Vispo, Carmen Solera, Carmen de Mendoza, Ana Treviño, Eva Poveda, Gustavo Manuzza, Lourdes Anta.

Hospital Clinic – IDIBAPS, Universidad de Barcelona (Barcelona): José M. Miró, Christian Manzardo, Laura Zamora, Iñaki Pérez, M<sup>a</sup> Teresa García, Carmen Ligero, José Luis Blanco, Felipe García-Alcaide, Esteban Martínez, Josep Mallolas, José M. Gatell.

Hospital Doce de Octubre (Madrid): Rafael Rubio, Federico Pulido, Silvana Fiorante, Jara Llenas, Violeta Rodríguez, Mariano Matarranz.

Hospital Donostia (San Sebastián): José Antonio Iribarren, Julio Arrizabalaga, María José Aramburu, Xabier Camino, Francisco Rodríguez-Arondo, Miguel Ángel von Wichmann, Lidia Pascual Tomé, Miguel Ángel Goenaga, M<sup>a</sup> Jesús Bustinduy, Harkaitz Azkune Galparsoro.

Hospital General Universitario de Elche (Elche): Félix Gutiérrez, Mar Masía, Sergio Padilla, Cristina López, Juan Carlos Rodríguez, Andrés Navarro, Fernando Montolio, Catalina Robledano García, Rafael Pascual.

Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona): Bonaventura Clotet, Cristina Tural, Lidia Ruiz, Cristina Miranda, Roberto Muga, Jordi Tor, Arantza Sanvisens.

Hospital Gregorio Marañón (Madrid): Juan Berenguer, Juan Carlos López Bernaldo de Quirós, Pilar Miralles, Jaime Cosín

Ochaíta, Matilde Sánchez Conde, Isabel Gutiérrez Cuellar, Margarita Ramírez Schacke, Belén Padilla Ortega, Paloma Gijón Vidaurreta.

Hospital Universitario La Paz (Madrid): Juan González García, Ignacio Bernardino de la Serna, José Ramón Arribas López, María Luisa Montes Ramírez, Jose M<sup>a</sup> Peña, Blanca Arribas, Juan Miguel Castro, Francisco Javier Zamora Vargas, Ignacio Pérez Valero, Miriam Estébanez, Silvia García Bujalance, Natalia Stella y Jesús Mingorance.

Hospital de la Princesa (Madrid): Ignacio de los Santos, Jesús Sanz Sanz, Ana Salas Aparicio, Cristina Sarriá Cepeda.

Hospital San Pedro-CIBIR (Logroño): José Antonio Oteo, José Ramón Blanco, Valvanera Ibarra, Luis Metola, Mercedes Sanz, Laura Pérez-Martínez.

Hospital Universitario Mutua de Terrassa (Terrassa): David Dalmau, Angels Jaén Manzanera, Mireia Cairó Llobell, Daniel Irigoyen Puig, Laura Ibáñez, Queralt Jordano Montañez, Mariona Xercavins Valls, Javier Martínez-Lacasa, Pablo Velli, Roser Font.

Hospital de Navarra (Pamplona): María Rivero, Itziar Casado, Jorge Díaz, Javier Uriz, Jesús Repáraz, Carmen Irigoyen, María Jesús Arraiza.

Hospital Parc Taulí (Sabadell): Ferrán Segura, María José Amengual, Eva Penelo, Gemma Navarro, Montserrat Sala, Manuel Cervantes, Valentín Pineda.

Hospital Ramón y Cajal (Madrid): Santiago Moreno, José Luis Casado, Fernando Dronza, Ana Moreno, María Jesús Pérez Elías, Dolores López, Carolina Gutiérrez, Beatriz Hernández, María Pumares, Paloma Martí.

Hospital San Cecilio (Granada): Federico García García, José Hernández Quero, Alejandro Peña Monje, Leopoldo Muñoz Medina, Jorge Parra Ruiz, Vicente Guillot, Marta Alvarez y Natalia Chueca.

Centro Sanitario Sandoval (Madrid): Jorge Del Romero Guerrero, Carmen Rodríguez Martín, Teresa Puerta López, Juan Carlos Carrió Montiel, Paloma Raposo, Mar Vera García y Juan Ballesteros Martín.

Hospital Son Espases (Palma de Mallorca): Melchor Riera, Javier Murillas, María Peñaranda, María Leyes, M<sup>a</sup> Angels Ribas, Antoni Campins, Concepcion Vallalonga, Carmen Vidal.

Hospital Universitario de Valme (Sevilla): Juan Antonio Pineda, Eva Recio Sánchez, Fernando Lozano de León, Juan Macías, José Carlos Palomares, Manuel Parra, Jesús Gómez-Mateos.

Hospital Virgen de la Victoria (Málaga): Jesús Santos González, Manuel Márquez Solero, Isabel Viciána Ramos, Rosario Palacios Muñoz.

Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla): Pompeyo Viciána, Manuel Leal, Luis Fernando López-Cortés, Mónica Trastoy, Pilar Pérez Romero.

Centro Colaborador: Centro Nacional de Microbiología (Majadahonda): Lucía Pérez Álvarez, Miguel Thomson Oka-tsu, Elena Delgado Blanco, Yolanda Vega Rocha.

## References

1. Caro-Murillo AM, Castilla J, Pérez-Hoyos S *et al.* Spanish cohort of naïve human immunodeficiency virus infected patients (CoRIS): rationale, organization and initial results. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25: 23–31.
2. García F, Pérez-Cachafeiro S, Guillot V *et al.* 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: 150–153.
3. Grupo de Estudio de SIDA. (GESIDA). Recomendaciones de GESIDA/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25: 32–53.
4. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D *et al.* Drug resistance mutations for surveillance of transmitted human immunodeficiency virus type 1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One* 2009; 4: e4724.
5. de Mendoza C, Rodríguez C, Colomina J *et al.* Resistance to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors and prevalence of human immunodeficiency virus type 1 non-B subtypes are increasing among persons with recent infection in Spain. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1350–1354.
6. Audelin AM, Gerstoft J, Obel N *et al.* Molecular phylogenetics of transmitted drug resistance in newly diagnosed HIV Type 1 individuals in Denmark, a Nation-Wide Study. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011; 27: 1283–1290.
7. Weinstock HS, Zaidi I, Heneine W *et al.* The epidemiology of antiretroviral drug resistance among drug-naïve human immunodeficiency virus type 1 infected persons in 10 US cities. *J Infect Dis* 2004; 189: 2174–2180.
8. Taniguchi T, Nurutdinova D, Grubb JR *et al.* Transmitted drug-resistant HIV Type 1 remains prevalent and impacts virologic outcomes despite genotype-guided antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2012; 28: 259–264. [Epub 2011 August 30].
9. De Gascun CF, Waters A, Regan C *et al.* Documented prevalence of HIV type 1 antiretroviral transmitted drug resistance in Ireland from 2004 to 2008. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2012; 28: 276–281.
10. Hurt CB, McCoy SI, Kuruc J *et al.* Transmitted antiretroviral drug resistance among acute and recent human immunodeficiency virus infections in North Carolina from 1998 to 2007. *Antivir Ther* 2009; 14: 673–678.
11. Wittkop L, Günthard HF, de Wolf F *et al.* Effect of transmitted drug resistance on virological and immunological response to initial combination antiretroviral therapy for HIV (EuroCoord-CHAIN joint project): a European multicohort study. *Lancet Infect Dis* 2011; 11: 363–371. [Epub 2011 February 25].
12. Oette M, Reuter S, Kaiser R *et al.* Epidemiology of transmitted drug resistance in chronically HIV-infected patients in Germany: The RESINA Study 2001–2009. RESINA Study group. *Intervirology* 2012; 55: 154–159.
13. Payne B, Nsutebu E, Hunter E *et al.* Low prevalence of transmitted antiretroviral drug resistance in a large UK HIV-1 cohort. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 464–468.
14. Descamps D, Chaix ML, Montes B *et al.* Increasing prevalence of transmitted drug resistance mutations and non-B subtype circulation in antiretroviral-naïve chronically HIV-infected patients from 2001 to 2006/2007 in France. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 2620–2627.

15. Vercauteren J, Wensing AM, van de Vijver DA *et al.* Transmission of drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 is stabilizing in Europe. *J Infect Dis* 2009; 200: 1503–1508.
16. Yerly S, von Wyl V, Ledergerber B *et al.* Transmission of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance in Switzerland: a 10-year molecular epidemiology survey. *AIDS* 2007; 21: 2223–2229.
17. Bartmeyer B, Kuecherer C, Houareau C *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; 10: e12718.
18. Frentz D, van de Vijver DA, Boucher CA, Albert J. Estimates of HIV transmitted drug resistance can be inflated due to natural sequence polymorphisms. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011; 5: e135–e137. (Letter).

## **Anexo III**

***Clinically relevant transmitted drug resistance to first line antiretroviral drugs and implications for recommendations.***

**(Estudio 3)**

# Clinically Relevant Transmitted Drug Resistance to First Line Antiretroviral Drugs and Implications for Recommendations

Susana Monge<sup>1</sup>, Vicente Guillot, Marta Alvarez<sup>2</sup>, Natalia Chueca, Natalia Stella<sup>3</sup>, Alejandro Peña<sup>2</sup>, Rafael Delgado<sup>4</sup>, Juan Córdoba<sup>5</sup>, Antonio Aguilera<sup>6</sup>, Carmen Vidal<sup>7</sup>, Federico García<sup>2\*</sup>, CoRIS<sup>1</sup>

**1** National Centre of Epidemiology, Madrid, Spain, **2** Microbiology Department, San Cecilio University Hospital, Instituto Biosanitario de Investigación (IBIG), Granada, Spain, **3** Infectious Diseases Unit, La Paz University Hospital/IdiPAZ, Madrid, Spain, **4** Microbiology Department, Doce de Octubre University Hospital, Madrid, Spain, **5** Microbiology Department, La Fe University Hospital, Valencia, Spain, **6** Microbiology Department, University Hospital of Santiago, Santiago de Compostela, Spain, **7** Microbiology Department, Son Espases University Hospital, Palma de Mallorca, Spain

## Abstract

**Background:** The aim was to analyse trends in clinically relevant resistance to first-line antiretroviral drugs in Spain, applying the Stanford algorithm, and to compare these results with reported Transmitted Drug Resistance (TDR) defined by the 2009 update of the WHO SDRM list.

**Methods:** We analysed 2781 sequences from ARV naive patients of the CoRIS cohort (Spain) between 2007–2011. Using the Stanford algorithm “Low-level resistance”, “Intermediate resistance” and “High-level resistance” categories were considered as “Resistant”.

**Results:** 70% of the TDR found using the WHO list were relevant for first-line treatment according to the Stanford algorithm. A total of 188 patients showed clinically relevant resistance to first-line ARVs [6.8% (95% Confidence Interval: 5.8–7.7)], and 221 harbored TDR using the WHO list [7.9% (6.9–9.0)]. Differences were due to a lower prevalence in clinically relevant resistance for NRTIs [2.3% (1.8–2.9) vs. 3.6% (2.9–4.3) by the WHO list] and PIs [0.8% (0.4–1.1) vs. 1.7% (1.2–2.2)], while it was higher for NNRTIs [4.6% (3.8–5.3) vs. 3.7% (3.0–4.7)]. While TDR remained stable throughout the study period, clinically relevant resistance to first line drugs showed a significant trend to a decline ( $p = 0.02$ ).

**Conclusions:** Prevalence of clinically relevant resistance to first line ARVs in Spain is decreasing, and lower than the one expected looking at TDR using the WHO list. Resistance to first-line PIs falls below 1%, so the recommendation of screening for TDR in the protease gene should be questioned in our setting. Cost-effectiveness studies need to be carried out to inform evidence-based recommendations.

**Citation:** Monge S, Guillot V, Alvarez M, Chueca N, Stella N, et al. (2014) Clinically Relevant Transmitted Drug Resistance to First Line Antiretroviral Drugs and Implications for Recommendations. PLoS ONE 9(3): e90710. doi:10.1371/journal.pone.0090710

**Editor:** Luis Menéndez-Arias, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Spain

**Received:** November 19, 2013; **Accepted:** February 3, 2014; **Published:** March 17, 2014

**Copyright:** © 2014 Monge et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III through the Red Temática de Investigación Cooperativa en Sida [ISCIII-RETIC RD06/006 and RD12/0017], and through Grant n° PI12/01053. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: fegarcia@ugr.es

† Membership of CoRIS is provided in the Acknowledgments

## Introduction

HIV drug resistance due to transmitted mutations in the reverse transcriptase (RT) and protease (Pro) regions has been associated with a higher risk of virological failure to first line antiretroviral therapy (ART) [1], having a greater impact for initial regimens containing a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) [2]. Testing for transmitted drug resistance (TDR) in newly diagnosed patients with HIV is strongly recommended by treatment guidelines [3–6], as it has shown to be cost-effective, in terms of gain in quality-adjusted life year (QALYs) when drug resistance prevalence is over 1–5% [7].

The Spanish cohort of naïve HIV infected individuals (CoRIS) offers relevant information about the current epidemiological

profile of HIV infection [8,9], and is an excellent scenario to characterise the prevalence of TDR over time in Spain. Two previous analyses of viral sequences in CoRIS were carried out for the periods 2004–2008 and 2007–2010, and have been published elsewhere [10,11]. For these two previous studies, we used the 2009 update World Health Organization (WHO) comprehensive list of mutations [12], which has been also widely used for TDR evaluation [13–16].

WHO mutations list has overcome the major limitation of TDR studies across the world, thus providing high levels of standardization into these studies. However, it defines TDR to the different classes of antiretroviral drugs based on the presence of at least one mutation related to drug resistance, while first line treatment drugs

that are currently approved by many of the latest updates of clinical guidelines, often include compounds, for which more than one mutation is necessary in order to reduce *in vivo* drug activity (e.g. abacavir, and boosted Protease Inhibitors). Further approaches, such as the Stanford HIV Drug Resistance Database algorithm, calculate the effective resistance given the combination of mutations present in a particular strain, allowing analyzing clinically relevant resistance to specific antiretroviral drugs (ARVs) and regimens, providing a complementary and invaluable input for informing clinical recommendations.

The objective of this study was to analyse clinically relevant resistance to drugs included in recommended first-line regimens in Spain (CoRIS) from 2007 to 2011, using the Stanford algorithm, and compare it to TDR, defined by the WHO list of mutations.

## Patients and Methods

CoRIS is an open, multicentre, prospective cohort of HIV-positive, antiretroviral-naïve subjects over 13 years of age, including both seroprevalent and seroconverter patients. Subjects are recruited and followed up in 31 HIV units from 13 of the 17 Autonomous Communities of Spain. Ethics approval was obtained from participating sites and a written informed consent was obtained from every patient included in the study. Detailed descriptions of the cohort have been previously published [3,9]. As part of the cohort data collection process, which began in 2004, sites are asked every year to provide a FASTA viral sequence, encoding the HIV protease and RT obtained at the time of inclusion, available from routine resistance testing. As of October 2011, 23 sites from 10 Autonomous Communities were collaborating in the collection of FASTA sequences. In the cohort-coordinating centre, these sequences are linked to clinical and epidemiological data of the patient. Further, the cohort coordinating centre double checks that dates of FASTA sample collection are previous to initiation of ART. Study period for this analysis was from January 2007 to October 2011 and only naïve patients with availability of a FASTA sequence of medium or high quality were included. Sequence data may be available to qualified researchers upon request.

Clinically relevant drug resistance to the first line antiretrovirals (ARVs) included in recommended first-line regimens in Spain as of current guidelines [6] [abacavir, emtricitabine, lamivudine and tenofovir, (Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors, NRTIs), efavirenz and nevirapine (Non-Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors, NNRTIs), atazanavir, darunavir and lopinavir (Protease Inhibitors, PIs)] was evaluated using the Stanford Database algorithm [17]. For analysis, Stanford HIVdb “Low-level resistance”, “Intermediate resistance” and “High-level resistance” categories were considered as “Resistant”, while “Susceptible” and “Potential Low Level Resistance” were pooled into Susceptible. For subsequent genotypic sensitivity score (GSS) analysis, “Susceptible” and “Potential Low Level Resistance” were scored as 1, “Low Level Resistance” and “Intermediate Resistance” were pooled into Intermediate and scored as 0.5, and “High Level Resistance” was scored as 0. GSS was calculated adding individual resistance scores for each first-line drug in the regimen.

Alternatively, transmitted drug resistance (TDR) associated mutations were evaluated following the WHO surveillance drug resistance mutation list updated in 2009 by Bennett and colleagues [12].

The sample was described using proportion or median (interquartile range) for categorical and continuous variables, respectively; and bivariate analysis was performed using Chi

Square or Kruskal-Wallis test as appropriate. Resistance mutations were described using prevalence, and the corresponding confidence intervals were calculated with an analytically derived variance estimator. Their linear trend over the study period was analysed using chi-square test for trend. Significance level was 5%. All the analyses were conducted using Stata software (V.11.1, Stata Corporation, College Station, Texas, USA).

## Results

A total of 23 out of the 28 centres in CoRIS contributed FASTA sequences from 2007 to 2011. These centres provided 7,351 patients, 92.2% of the CoRIS cohort, and a complete naïve sequence was submitted for 2,781 (37.8%). Compared to the total cohort, those with an available FASTA sequence were younger (median age 33.9 vs. 34.9), more frequently males (88.3% vs. 83.9%), infected through sex between men (69.2% vs. 58.9%), with a higher educational level (63.5% vs. 56.2%), originating from Spain compared to other regions (70.1% vs. 68.0%), and recruited in earlier stages of HIV disease progression (CD4 count at recruitment 424 vs. 323 cells/mm<sup>3</sup>). All differences were statistically significant at  $p < 0.01$ .

A description of the study population by year in which sample for sequencing was obtained is shown in Table 1. An increase in the proportion of men who have sex with men (MSM), of subjects with a higher education, and of patients at earlier CDC stages and higher CD4 counts was observed over time. Median time from cohort entry to resistance study was -1 day (IQR: -21 to 13).

### Transmitted Drug Resistance (TDR) according to the WHO list

A total of 221 patients had at least one mutation among those contained in the WHO surveillance list, giving a prevalence of TDR of 7.9% (95% Confidence Interval: 6.9–9.0). Regarding mutations affecting specific ARV classes, similar prevalence of TDR was found for nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) and non-NRTIs (NNRTIs), being 3.6% (2.9–4.3) for NRTIs and 3.7% (3.0–4.7) for NNRTIs. TDR to protease inhibitors (PIs) was less prevalent, of 1.7% (1.2–2.2). Figure 1 shows prevalence of TDR for each ARV class throughout the study period. TDR to NNRTIs decreased from 5.2% in 2007 to 2.8% in 2011, although the trend was not statistically significant. TDR to more than one class of ARV was uncommon; 1.0% (0.6–1.3) and 0.1% (0.0–0.2) of the subjects showed TDR to a minimum of two or three ARV classes, respectively. TDR to two ARV classes decreased from 1.5% in 2007 to 0.3% in 2011, but again was not statistically significant.

Table 2 shows prevalence of specific mutations in the WHO surveillance list. The main mutation related to TDR to NNRTI was K103N/S, which had a prevalence of 2.8% (2.2–3.4). Three mutations were identified as being mainly responsible for TDR to NRTIs: T215 revertants (C/D/E/N/I/V/S) (1.3%; 0.9–1.8), M41L (1.2%; 0.8–1.5) and K219EQNR (1.0%; 0.7–1.4). For PIs, the mutation mainly responsible for TDR was M46IL (0.9%; 0.6–1.3). Of interest, a single mutation (singleton) was responsible for TDR to NRTIs, NNRTIs or PIs in 55.5%, 85.3% and 93.8% of the cases.

### Clinically relevant resistance to first-line drugs according to the Stanford Algorithm

When investigating clinically relevant resistance to ARV drugs that make part of recommended initial regimens, the number of patients that showed any resistance was 188, for a total prevalence of 6.8% (5.8–7.7). Prevalence of clinically relevant resistance to

**Table 1.** Baseline characteristics of the study population.

	2007		2008		2009		2010		2011		Total		p	
	(N = 484)		(N = 582)		(N = 596)		(N = 756)		(N = 363)		(N = 2,781)			
	n	(%)	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
Sex (Male)	436	90.1	481	82.6	529	88.8	683	90.3	326	89.8	2,455	88.3	<0.01	
Age*, Median (IQR)	33.8 (28.3–41.0)		34.3(28.2–41.5)		33.2(28.0–39.7)		34.5(28.5–41.6)		33.8(27.3–42.3)		33.9 (28.2–41.0)		0.37	
Mode of transmission	IDU	35	7.2	47	8.1	27	4.5	38	5.0	14	3.9	161	5.8	
	MSM	321	66.3	347	59.6	429	72.0	550	72.8	278	76.6	1,925	69.2	<0.01
	Heterosexual	119	24.6	178	30.6	126	21.1	140	18.5	63	17.4	626	22.5	
	Other/NA	9	1.9	10	1.7	14	2.4	28	3.7	8	2.2	69	2.5	
Country of origin	Spain	331	68.4	408	70.1	435	73.0	513	67.9	262	72.2	1,949	70.1	
	Africa	22	4.5	23	4.0	27	4.5	23	3.0	7	1.9	102	3.7	0.07
	Latin America	106	21.9	108	18.6	106	17.8	174	23.0	67	18.5	561	20.2	
	Other/unknown	25	5.2	43	7.4	28	4.7	46	6.1	27	7.4	169	6.1	
Educational level	Lower	127	26.2	175	30.1	148	24.8	191	25.3	88	24.2	729	26.2	
	Higher	299	61.8	341	58.6	380	63.7	503	66.5	244	67.2	1,767	63.5	<0.05
	Unknown	58	12.0	66	11.3	68	11.4	62	8.2	31	8.5	285	10.3	
Viral Load* (log c/ N ml)		349		429		440		622		291		2,131		0.11
	Median (IQR)	4.5 (4.0–5.1)		4.6 (4.0–5.0)		4.6 (4.0–5.1)		4.6 (4.1–5.1)		4.7 (4.2–5.2)		4.6 (4.1–5.1)		
CD4 count * (cells/ N mm3)		416		501		503		699		330		2,449		<0.05
	Median (IQR)	392 (237–604)		371 (223– 559)		396 (251– 593)		413 (276–580)		432(260–606)		399 (251–588)		
Duration of the infection*	Recent infection	43	8.9	47	8.1	51	8.6	70	9.3	34	9.4	245	8.8	
	Chronic infection	112	23.1	121	20.8	138	23.1	169	22.3	76	20.9	616	22.2	0.96
	Not evaluable	329	68.0	414	71.1	407	68.3	517	68.4	253	69.7	1,920	69.0	
CDC stage*	P/A	402	83.6	492	84.8	537	90.2	658	87.2	326	89.8	2,415	87.1	
	B	40	8.3	38	6.6	29	4.9	53	7.0	23	6.3	183	6.6	<0.05
	C	39	8.1	50	8.6	29	4.9	44	5.8	14	3.9	176	6.3	
History of delayed diagnosis	Yes	149	30.8	205	35.2	169	28.4	218	28.8	114	31.4	855	30.7	
	No	248	51.2	277	47.6	325	54.5	439	58.1	192	53.0	1,481	53.3	<0.05
	Not evaluable	87	18.0	100	17.2	102	17.1	99	13.1	57	15.7	445	16.0	

\*At the time of the resistance testing; IDU: injecting drug users; MSM: men who have sex with men; P/A: Primoinfection or CDC stage A; NA: Not available; IQR: interquartile range.

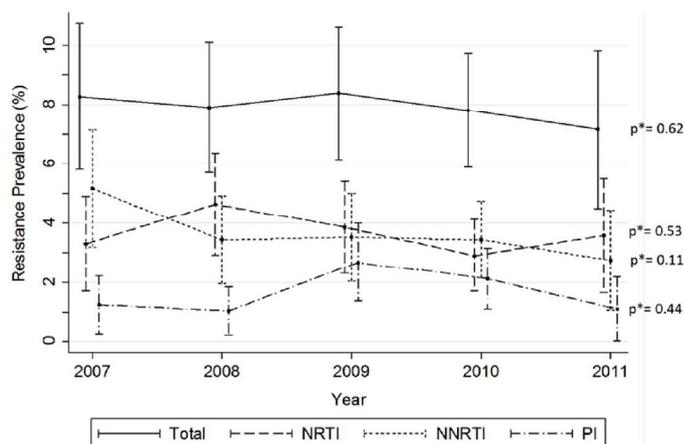
doi:10.1371/journal.pone.0090710.t001

any first line ARV was lower than TDR for NRTIs [2.3% (1.8–2.9)] and PIs [0.8% (0.4–1.1)], while it increased in the case of NNRTIs to reach 4.6% (3.8–5.3). In fact, only 70.1% of patients harboring TDR actually showed any clinically relevant resistance to first-line drugs. Percentages for NRTIs and PIs were 65.3% and 35.4%, respectively. For NRTIs, the mutations responsible for having TDR, but without clinically relevant resistance to first line drugs, were present mainly as singletons: a Thymidine Associated Mutation (TAM) alone (M41L, n = 8; T69D, n = 1; K70R, n = 1; L210W, n = 4; K219N/Q, n = 7), a T215 revertant alone (D/N/S n = 7), a F77L alone (n = 2), or a combination of D67N+K219Q (n = 4), or D67N+T69D (n = 1). For PIs, mutations responsible for these discordances were always detected as singletons (L24I, n = 1; D30N, n = 1; M46I/L, n = 2; F53Y, n = 1; V82L, n = 2 and N88D, n = 2). On the other hand, the increase in clinically relevant resistance for NNRTIs was driven mainly by the combination of two or more mutations that are not present in

the WHO list (V90I+V108I+H221Y, n = 1; A98G+V179E, n = 1; V108I+E138A, n = 3; V108I+V179E, n = 2; E138A+V179D, n = 2; E138A+V179D+Y188H, n = 1; V179D+ V106I, n = 1), and in 7 cases by the presence of a A98G singleton.

Figure 2 shows the prevalence of clinically relevant resistance to first line ARV drugs by ARV class. A significant decrease (p = 0.02) was found from 2007 (8.1%) to 2011 (4.7%), explained by a borderline statistical significance decrease in both NRTIs and NNRTI. No trend was found in case of PIs. Primary drug resistance to two or three ARV classes was low, of 0.8% (0.5–1.2) and of 0.04% (0.0–0.1), respectively.

For individual first line NRTIs, clinically relevant resistance was 2.2% (1.7–2.8) for abacavir, 0.7% (0.4–1.0) for emtricitabine and lamivudine, and 1.6% (1.1–2.1) for tenofovir; for first line NNRTIs, resistance was observed in 4.0% (3.3–4.8) for efavirenz and 4.6% (3.8–5.3) for nevirapine; finally, for PIs, resistance was



**Figure 1. Prevalence of TDR (WHO SDRM estimates) by antiretroviral class between 2007 and 2011.** NRTI: nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTI: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors; PI: protease inhibitors. \* p value for Chi-square test for trend. doi:10.1371/journal.pone.0090710.g001

observed in 0.7% (0.4–1.0) for atazanavir, 0.1% (0.0–0.3) for darunavir, and 0.3% (0.1–0.5) for lopinavir.

#### Therapeutic barrier to resistance of first-line drug regimens

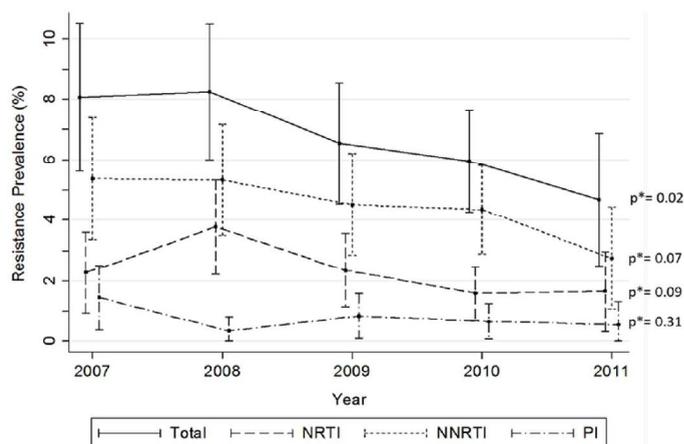
Table 3 shows resistance when combining these drugs into first line recommended regimens. Overall, 188 patients (6.8%) showed

resistance to at least one regimen (GSS  $\leq 3$ ). Most affected regimens were those containing NNRTIs with patients showing resistance between 5.6% and 6.2%, depending on the specific combination of drugs. Resistance to PI based regimens was less common, between 2.2% and 2.7%. Of note, only 0.7% to 0.9% of the PI containing regimens showed two or less fully active drugs.

**Table 2. Prevalence of mutations from the WHO transmitted drug resistance surveillance list.**

NRTI mutations			NNRTI mutations			PI mutations		
Mutation	N	(Pv, %)	Mutation	n	(Pv, %)	Mutation	n	(Pv, %)
M41L	32	(1.15)	L100I	2	(0.07)	L24I	2	(0.07)
K65R	1	(0.04)	K101EP	8	(0.29)	D30N	1	(0.04)
D67EGN	23	(0.83)	K103N/S	77	(2.77)	V32I	2	(0.07)
T69D	5	(0.18)	Y181CV	9	(0.32)	M46IL	26	(0.93)
K70ER	5	(0.18)	Y188CHL	5	(0.18)	I47AV	2	(0.07)
L74IV	3	(0.11)	G190AES	11	(0.40)	F53LY	2	(0.07)
F77L	2	(0.07)	P225H	3	(0.11)	I54ALMSTV	2	(0.07)
Y115F	2	(0.07)	M230L	1	(0.04)	V82ACFLMST	5	(0.18)
M184IV	13	(0.47)			N83D	1	(0.04)	
L210W	12	(0.43)			I85V	1	(0.04)	
T215REV*	37	(1.33)			N88DS	2	(0.07)	
T215YF	2	(0.07)			L90M	10	(0.36)	
K219EQNR	29	(1.04)						
1 mut.	56	(2.01)	1 mut.	87	(3.13)	1 mut.	45	(1.62)
2 mut.	32	(1.15)	2 mut.	13	(0.47)	2 mut.	2	(0.07)
$\geq 3$ mut.	13	(0.47)	$\geq 3$ mut.	2	(0.07)	$\geq 3$ mut.	1	(0.04)
Prevalence (95%CI)	3.6	(2.9–4.3)	Prevalence (95%CI)	3.7	(3.0–4.4)	Prevalence (95%CI)	1.7	(1.2–2.2)

NRTI: nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTI: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors; PI: protease inhibitors; Pv: prevalence; mut.:mutation. Amino acid abbreviations: A, alanine; C, cysteine; D, aspartate; E, glutamate; F, phenylalanine; G, glycine; H, histidine; I, isoleucine; K, lysine; L, leucine; M methionine; N, asparagine; P, proline; Q, glutamine; R, arginine; S, serine; T, threonine; V, valine; W, tryptophan; Y, tyrosine. \* = C/D/E/N/I/V/S. doi:10.1371/journal.pone.0090710.t002



**Figure 2. Prevalence of clinically relevant resistance to first line drugs (Stanford HIVdb) by antiretroviral class between 2007 and 2011.** NRTI: nucleoside reverse transcriptase inhibitors (abacavir, emtricitabine, lamivudine and tenofovir); NNRTI: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (efavirenz and nevirapine); PI: protease inhibitors (atazanavir, darunavir and lopinavir). \* p value for Chi-square test for trend. doi:10.1371/journal.pone.0090710.g002

## Discussion

Our study shows that, in Spain for the period 2007–2011, the prevalence of clinically relevant resistance to approved first line ARV drugs analyzed using the Stanford HIV interpretation system is lower than the one we would expect when looking at the Transmitted Drug Resistance (TDR) defined in the WHO mutations list. Moreover, a significant trend to a reduction in resistance was found, driven by a decrease in resistance to the first line NNRTIs efavirenz and nevirapine, as well as to the NRTIs abacavir, emtricitabine, lamivudine, and tenofovir, while resistance to the PIs atazanavir, darunavir and lopinavir, remained

stable and very low throughout the whole period. In contrast, no significant trend in the TDR defined by WHO list has been observed. Resistance to more than one antiretroviral class was very uncommon by year 2011.

Many studies have evaluated trends in TDR transmission across Europe and the US [10,11,13–16,18–21]. The use of the 2009 update of the WHO surveillance recommendations for the estimation of TDR has brought uniformity to all TDR surveys, and has had the great benefit of making all these studies comparable. It also has proved extremely useful for characterizing the epidemiology of TDR and carrying out population-based surveillance. However, its correlation with resistance to the different ARVs is not always straightforward, and further analysis of these mutations such as the one proposed by the Stanford HIV Resistance Database, can provide a complementary and useful input to clinicians, public health professionals and policy makers to develop evidence-based clinical guidelines.

In our study, TDR was of 7.9%, higher than clinically relevant resistance to first line drugs (prevalence of 6.8%). This shows that effective resistance to first line regimens in Spain would lie below the one we would expect when looking at the list of resistance mutations surveillance. In fact, up to 30% of patients harboring TDR did not actually show clinically relevant resistance, being this percentage higher in the case of PIs (65%) and NRTIs (34%). Specifically looking at clinical resistance to first line drugs is therefore relevant and can have important implications.

Clinically relevant resistance to first line PIs remained below 1% for all years except 2007, and was mostly of intermediate level, showing that transmitted resistance to PIs is not threatening effectiveness of PI-based first line ART in Spain. In agreement with what was previously suggested by an Irish report [14], our study greatly supports the hypothesis that there is no need from the clinical point of view to screen for PI resistance in our setting, though having the protease sequence may be useful for epidemiologic studies tracing TDR. A recent study has reported a misinterpretation of resistance to PIs, with an increase in the level of transmitted resistance to this class of antiretrovirals when using the WHO list [22]. In our study we have found that focusing

**Table 3. Therapeutic barrier of first line ARV regimens using Stanford Algorithm.**

ARV regimen		Genotypic Sensitivity Score			
		<3		≤2	
		n	(%)	n	(%)
EFV	TDF FTC/3TC	155	(5.6)	94	(3.4)
	ABC FTC/3TC	157	(5.7)	95	(3.4)
NVP	TDF FTC/3TC	169	(6.1)	109	(3.9)
	ABC FTC/3TC	171	(6.2)	109	(3.9)
LPV	TDF FTC/3TC	64	(2.3)	20	(0.7)
	ABC FTC/3TC	68	(2.5)	20	(0.7)
ATZ	TDF FTC/3TC	72	(2.6)	25	(0.9)
	ABC FTC/3TC	75	(2.7)	26	(0.9)
DRV	TDF FTC/3TC	61	(2.2)	19	(0.7)
	ABC FTC/3TC	65	(2.3)	19	(0.7)

\* Threshold of the genotypic sensitivity score (GSS) used to consider the strain as resistant to a given ARV combination. TDF: tenofovir; ABC: abacavir; 3TC: lamivudine; FTC: emtricitabine; EFV: efavirenz; NVP: nevirapine; LPV: lopinavir; DRV: darunavir; ATZ: atazanavir. doi:10.1371/journal.pone.0090710.t003

only on TDR may also overestimate the impact of circulating resistances on the clinical effectiveness of first-line PI-containing regimens. In fact, 93.8% of the patients with TDR to PIs harboured a single mutation (singleton) in the protease. For classes including drugs with a high genetic barrier to resistance, such as PIs [23], the presence of just one mutation should not preclude its further use for first line regimens. Specific studies on clinically relevant mutations would be needed for informing this decision.

In a similar way, we have also shown this effect for NRTIs, with a prevalence of TDR of 3.6%, and a prevalence of clinically relevant resistance to first line drugs of 2.3%. Again, singletons were responsible for these differences (55.5% of the patients with TDR to NRTIs harboured a single mutation). Abacavir and tenofovir are the two drugs in the NRTI class with the best resistance profile, being the least affected drugs by single mutations. In fact most of the discordant cases showing TDR showed resistance to zidovudine or stavudine, two NRTIs that are no longer included in Spanish and most international recommendations for first line treatment. In contrast, the NNRTI class, represented for first line with two low genetic barrier drugs, showed higher clinically relevant resistance than TDR. This difference was mainly driven by intermediate resistance calls for efavirenz and/or nevirapine by a combination of two or more mutations that are not included in the WHO list, or by the presence of A98G alone.

Evaluating resistance to specific drugs also allows evaluating the global therapeutic barrier of a regimen, measuring the global robustness to resistance of a certain combination rather than resistance to a certain drug. This may be of extreme importance for evaluating clinical resistance to first line regimens, establishing recommendations on how resistance testing should be performed on newly diagnosed patients, and updating treatment guidelines. In our study, first line NNRTI containing regimens showed the lowest therapeutic barrier, as 5.6% to 6.2% of the newly diagnosed patients from CoRIS, showed any degree of resistance to at least one of the drugs in the regimen. In contrast, the therapeutic barrier to first line PI-based regimens was much higher, with between 2.2% and 2.7% showing any degree of resistance, and only 0.7% to 0.9% of the patients with two or less active drugs in the regimen, most of them being fully resistant to emtricitabine or lamivudine. To our knowledge, this is the first study to estimate the therapeutic barrier of first line regimens, and our results reinforce the previously mentioned notion that, in our setting, a reverse transcriptase-only approach for resistance screening in naïve patients is a strategy that should be considered. Cost-effectiveness studies evaluating the different strategies are urgently needed to better inform drug resistance testing recommendations in our setting. Some other issues, related to the epidemiological value of having the protease sequence information, should be considered and modelled in this analysis.

Our study has several limitations. First, we have studied a subset of patients included in CoRIS, as a FASTA sequence was only available for 37.8% of the patients. Restricting to years after 2007, when the recommendation to screen for resistance in all patients was made, minimises the possibility of selective testing of patients with higher probability of resistance. Higher testing in younger males, MSM of Spanish origin and higher education could reflect clinicians' preferences and practices and higher agency of these patients. However, we cannot rule out that selection bias persists at a certain scale, resulting in an infra-estimation of resistance rates. Second, our sequencing data have been obtained through population sequencing and we have not investigated the presence of minor populations. As minor variants are known to have a greater impact on resistance to NNRTIs in naïve patients [24], it is

very unlikely that using this technology our main observations could have affected resistance to the other classes, in particular for the PI class. Finally, higher time since HIV infection can limit our ability to find resistance mutations that were present at infection. Unfortunately, we did not have information on the date of infection for most of the patients, although higher CD4 counts, lower percentage of patients in CDC C stage and a slightly higher percentage of recent infections in the latter calendar years could indicate an earlier HIV diagnosis. The fact that we have not found a decreasing trend in TDR (as of WHO list) indicates that this bias, if existing, is probably of small magnitude.

In summary, clinically relevant resistance to ART first line regimens in Spain estimated using the Stanford HIV resistance database algorithm has been found to be lower than the one we expected when looking at the WHO surveillance mutations list, and with a significant trend to a decline through the period 2007–2011. As PI-based first line regimens have shown the highest therapeutic barrier and primary resistance to first-line PIs has been found to be below 1%, we believe that there is a need to question the recommendation of screening for TDR in the protease gene in our setting, and that cost-effectiveness studies need to be carried out to inform evidence-based recommendations.

## Acknowledgments

This study would not have been possible without the collaboration of all the patients, physicians, nurses, and data managers who have taken part in the project.

**The members of Cohorte de la Red de Investigación en Sida (CoRIS) are:**

**Steering Committee:** Juan Berenguer, Julia del Amo, Federico García, Félix Gutiérrez, Pablo Labarga, Santiago Moreno and María Ángeles Muñoz-Fernández. **Field work, data management and analysis:** Paz Sobrino Vegas, Victoria Hernando Sebastián, Belén Alejos Ferreras, Débora Álvarez, Susana Monge, Inma Jarrín, Santiago Pérez Cachafeiro. **BioBank:** M Ángeles Muñoz-Fernández, Isabel García-Merino, Coral Gómez Rico, Jorge Gallego de la Fuente y Almudena García Torre. **Participating Centres:** Hospital Central de Asturias (Oviedo): Victor Asensi Álvarez, Eulalia Valle and José Antonio Cartón, Santiago Melón. Hospital Universitario de Canarias (Santa Cruz de Tenerife): Juan Luis Gomez Sirvent, Patricia Rodriguez Fortúnez, María Remedios Alemán Valls, María del Mar Alonso Socas, María Inmaculada Hernández Hernández, Felicitas Díaz-Flores, Dácil García Rosado and Ricardo Peláez González. Hospital Carlos III (Madrid): Vicente Soriano, Pablo Labarga, Pablo Barreiro, Francisco Blanco, Luz Martín Carbonero, Eugenia Vispo, Carmen Solera, Carmen de Mendoza, Ana Treviño, Eva Poveda, Gustavo Manuzza, Lourdes Anta. Hospital Clinic – IDIBAPS, universidad de Barcelona (Barcelona): José M. Miró, Christian Manzardo, Laura Zamora, Iñaki Pérez, M<sup>a</sup> Teresa García, Camen Ligeró, José Luis Blanco, Felipe García-Alcaide, Esteban Martínez, Josep Mallolas, José M. Gatell. Hospital Doce de Octubre (Madrid): Rafael Rubio, Federico Pulido, Silvana Fiorante, Jara Llenas, Violeta Rodríguez, Mariano Matarranz, Rafael Delgado. Hospital Donostia (San Sebastián): José Antonio Iribarren, Julio Arrizabalaga, María José Aramburu, Xabier Camino, Francisco Rodríguez-Arrondo, Miguel Ángel von Wichmann, Lidia Pascual Tomé, Miguel Ángel Goenaga, M<sup>a</sup> Jesús Bustinduy, Harkaitz Azkune Galparsoro. Hospital General Universitario de Elche (Elche): Félix Gutiérrez, Mar Masía, Sergio Padilla, Cristina López, Juan Carlos Rodríguez, Andrés Navarro, Fernando Montolio, Catalina Robledano García, Rafael Pascual. Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona): Bonaventura Clotet, Cristina Tural, Lidia Ruiz, Cristina Miranda, Roberto Muga, Jordi Tor, Arantza Sanvisens. Hospital Gregorio Marañón (Madrid): Juan Berenguer, Juan Carlos López Bernaldo de Quirós, Pilar Miralles, Jaime Cosín Ochaíta, Matilde Sánchez Conde, Isabel Gutiérrez Cuellar, Margarita Ramirez Schacke, Belén Padilla Ortega, Paloma Gijón Vidaurreta. Hospital Universitario La Paz (Madrid): Juan González García, Ignacio Bernardino de la Serna, José Ramón Arribas López, María Luisa Montes Ramírez, Jose M<sup>a</sup> Peña, Blanca Arribas, Juan Miguel Castro, Francisco Javier Zamora Vargas, Ignacio Pérez Valero, Miriam Estébanez, Sílvia García Bujalance, Natalia Stella y Jesús Mingorance. Hospital Universitario La Fé

(Valencia): José López Aldegue, Juan Córdoba Cortijo, José Miguel Molina, Marta Montero Alonso, Marino Blanes Juliá, Miguel Salavert Letú, José Lacruz Rodrigo, Eva Calabuig, Sandra Cuéllar. Hospital de la Princesa (Madrid): Ignacio de los Santos, Jesús Sanz Sanz, Ana Salas Aparicio, Cristina Sarriá Cepeda. Hospital San Pedro-CIBIR (Logroño): José Antonio Oteo, José Ramón Blanco, Valvanera Ibarra, Luis Metola, Mercedes Sanz, Laura Pérez-Martínez. Hospital Universitario Mutua de Terrassa (Terrassa): David Dalmau, Angels Jaén Manzanera, Mireia Cairó Lobell, Daniel Irigoien Puig, Laura Ibáñez, Queralt Jordano Montañez, Mariona Xercavins Valls, Javier Martínez-Lacasa, Pablo Velli, Roser Font. Hospital de Navarra (Pamplona): María Rivero, Itziar Casado, Jorge Díaz, Javier Uriz, Jesús Repáraz, Carmen Irigoien, María Jesús Arraiza. Hospital Parc Taulí (Sabadell): Ferrán Segura, María José Amengual, Eva Penelo, Gemma Navarro, Montserrat Sala, Manuel Cervantes, Valentín Pineda. Hospital Ramón y Cajal (Madrid): Santiago Moreno, José Luis Casado, Fernando Dronza, Ana Moreno, María Jesús Pérez Elías, Dolores López, Carolina Gutiérrez, Beatriz Hernández, María Pumaros, Paloma Martí. Hospital San Cecilio (Granada): Federico García García, José Hernández Quero, Alejandro Peña Monje, Leopoldo Muñoz Medina, Jorge Parra Ruiz, Vicente Guillot, Marta Alvarez y Natalia Chueca. Centro Sanitario Sandoval (Madrid): Jorge Del Romero Guerrero, Carmen Rodríguez Martín, Teresa Puerta López, Juan Carlos

Carrió Montiel, Paloma Raposo, Mar Vera García y Juan Ballesteros Martín. Hospital Son Espases (Palma de Mallorca): Melchor Riera, Javier Murillas, María Peñaranda, María Leyes, M<sup>a</sup> Angels Ribas, Antoni Campins, Concepcion Villalonga, Carmen Vidal. Hospital Universitario de Valme (Sevilla): Juan Antonio Pineda, Eva Recio Sánchez, Fernando Lozano de León, Juan Macías, José Carlos Palomares, Manuel Parra, Jesús Gómez-Mateos. Hospital Virgen de la Victoria (Málaga): Jesús Santos González, Manuel Márquez Solero, Isabel Viciano Ramos, Rosario Palacios Muñoz. Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla): Pompeyo Viciano, Manuel Leal, Luis Fernando López-Cortés, Mónica Trastoy, Pilar Pérez Romero. Hospital Universitario de Santiago (Santiago): Antonio Antela López, Arturo Prieto, Elena Losada, Antonio Aguilera Ortiz. Centro Colaborador: Centro Nacional de Microbiología (Majadahonda): Lucía Pérez Alvarez, Miguel Thomson Okatsu, Elena Delgado Blanco, Yolanda Vega Rocha.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FG SM MA VG. Performed the experiments: FG SM MA VG. Analyzed the data: SM VG MA. Wrote the paper: FG SM VG MA NC NS AP RD JC AA CV.

## References

- Wittkop L, Günthard HF, de Wolf F, Dunn D, Cozzi-Lepri A, et al. (2011) Effect of transmitted drug resistance on virological and immunological response to initial combination antiretroviral therapy for HIV (EuroCoord-CHAIN joint project): a European multicohort study. *Lancet Infect Dis* 11: 363–371.
- Kuritzkes DR, Lalama CM, Ribaud HJ, Marcial M, Meyer WA 3rd, et al. (2008) Preexisting resistance to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors predicts virologic failure of an efavirenz-based regimen in treatment-naïve HIV-1-infected subjects. *J Infect Dis* 197: 867–870.
- European AIDS clinical Society. EACS Guidelines v6.1. Available: <http://www.europeanaidssociety.org>. Accessed: 12 Nov 2012.
- Office of AIDS Research Advisory Council (OARAC). Bethesda (US). Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents. Available: <http://www.aidsinfo.nih.gov/>. Accessed: 28 Mar 2012.
- Thompson MA, Aberg JA, Hoy JF, Telenti A, Benson C, et al. (2012) Antiretroviral Treatment of Adult HIV Infection: 2012 Recommendations of the International Antiviral Society–USA Panel. *JAMA* 308: 387–402.
- Grupo de Estudio de SIDA. Documento de consenso de Gesida/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antiretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (Actualización enero 2013). Available: <http://www.gesida-seimc.org>. Accessed: 6 Mar 2013.
- Sax PE, Islam R, Walensky RP, Losina E, Weinstein MC, et al. (2005) Should resistance testing be performed for treatment-naïve HIV-infected patients? A cost-effectiveness analysis. *Clin Infect Dis* 41: 1316–1323.
- Caro-Murillo AM, Castilla J, Pérez-Hoyos S, Miró JM, Podzamczak D, et al. (2007) Spanish cohort of naïve human immunodeficiency virus infected patients (CoRIS): rationale, organization and initial results. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 25: 23–31.
- Sobriño-Vegas P, Gutiérrez F, Berenguer J, Labarga P, García F, et al. (2011) The cohort of the Spanish HIV research network (coris) and its associated biobank: organizational issues, main findings and losses to follow-up. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 29: 645–653.
- García F, Pérez-Cachafeiro S, Guillot V, Alvarez M, Pérez-Romero P, et al. (2011) Transmission of HIV drug resistance and non-B subtype distribution in ve HIV-infected individuals (CoRIS). *Antivir Res* 91: 150–153.
- Monge S, Guillot V, Alvarez M, Peña A, Viciano P, et al. (2012) 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* 18: E485–490.
- Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, et al. (2009) Drug resistance mutations for surveillance of transmitted human immunodeficiency virus type 1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One* 4: e4724.
- Karlsson A, Björkman P, Bratt G, Ekvall H, Gisslén M, et al. (2012) Low prevalence of transmitted drug resistance in patients newly diagnosed with HIV-1 infection in Sweden 2003–2010. *PLoS One* 7: e33484.
- De Gascun CF, Waters A, Regan C, O'Halloran J, Farrell G, et al. (2012) Documented Prevalence of HIV Type 1 Antiretroviral Transmitted Drug Resistance in Ireland from 2004 to 2008. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28: 276–281.
- Dolling D, Sabin C, Delphech V, Smit E, Pozniak A, et al. (2012) Time trends in drug resistant HIV-1 infections in the United Kingdom up to 2009: multicentre observational study. *BMJ* 345: e5253.
- Descamps D, Chai ML, Montes B, Pakianather S, Charpentier C, et al. (2010) Increasing prevalence of transmitted drug resistance mutations and non-B subtype circulation in antiretroviral-naïve chronically HIV-infected patients from 2001 to 2006/2007 in France. *J Antimicrob Chemother* 65: 2620–2627.
- Liu TF, Shafer RW (2006) Web Resources for HIV type 1 Genotypic-Resistance Test Interpretation. *Clin Infect Dis* 42: 1608–1618.
- Bartmeyer B, Kuecherer C, Houareau C, Werning J, Keeren K, et al. (2010) Prevalence of transmitted drug resistance and impact of transmitted resistance on treatment success in the German HIV-1 Seroconverter Cohort. *PLoS One* 5: e12718.
- Vercauteren J, Wensing AM, van de Vijver DA, Albert J, Balotta C, et al. (2009) Transmission of drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 is stabilizing in Europe. *J Infect Dis* 200: 1503–1508.
- Hurt CB, McCoy SI, Kuruc J, Nelson JA, Kerkau M, et al. (2009) Transmitted antiretroviral drug resistance among acute and recent human immunodeficiency virus infections in North Carolina from 1998 to 2007. *Antivir Ther* 14: 673–678.
- Price MA, Wallis CL, Lakhai S, Karita E, Kamali A, et al. (2011) Transmitted HIV type 1 drug resistance among individuals with recent HIV infection in East and Southern Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27: 5–12.
- Frentz D, van de Vijver DA, Boucher CA, Albert J (2011) Estimates of HIV transmitted drug resistance can be inflated due to natural sequence polymorphisms. *J Acquir Immune Defic Syndr* 58: e135–137.
- Beerenwinkel N, Däumer M, Sing T, Rahnenführer J, Lengauer T, et al. (2005) Estimating HIV evolutionary pathways and the genetic barrier to drug resistance. *J Infect Dis* 191: 1953–1960.
- Li JZ, Paredes R, Ribaud HJ, Kozal MJ, Svarovskaia ES, et al. (2013) Impact of minority nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutations on resistance genotype after virologic failure. *J Infect Dis* 207: 893–897.