



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



SERVIZO
GALEGO
de SAÚDE | Xerencia Xestión Integrada
A Coruña

**CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA Y
VIROLÓGICA DE LOS NUEVOS DIAGNÓSTICOS DE
INFECCIÓN POR EL VIH-1 (2004-2015): IMPACTO EN
LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO
ANTIRRETROVIRAL**

TESIS DOCTORAL

Berta Pernas Souto

A Coruña, 2016

TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA Y VIROLÓGICA DE LOS NUEVOS DIAGNÓSTICOS DE INFECCIÓN POR EL VIH-1 (2004-2015): IMPACTO EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL

Esta memoria ha sido presentada para optar al grado de
Doctor en Ciencias de la Salud por la Universidad de A
Coruña por la licenciada:

Berta Pernas Souto

Directores de Tesis:

Dra. Eva Poveda López

Doctora en Microbiología Médica

Grupo de Virología Clínica

Instituto Investigación Biomédica de A Coruña

Dr. José Domingo Pedreira Andrade

Doctor en Medicina

Jefe de Servicio de Medicina Interna

C. Hospitalario Universitario de A Coruña



Los directores de esta tesis doctoral, Dña. Eva Poveda López y D. José Domingo Pedreira Andrade

CERTIFICAN:

Que Dña. Berta Pernas Souto, Licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad de Santiago de Compostela, ha realizado en la Unidad de VIH y Hepatitis del Servicio de Medicina Interna del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, y en el Grupo de Virología Clínica del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña, y bajo su dirección, el trabajo “Caracterización Epidemiológica, Clínica y Viroológica de los Nuevos Diagnósticos de Infección por el VIH-1 (2004-2015): Impacto en la Respuesta al Tratamiento Antirretroviral”, el cual, reúne todas las condiciones para ser presentado como Tesis Doctoral, en la modalidad compendio por artículos de investigación.

Y para que así conste, firman el presente certificado en A Coruña, a 18 de mayo de 2016.

Dra. Eva Poveda López

Directora

Dr. José D. Pedreira Andrade

Director

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que, en cierta medida, han participado, con su apoyo y ayuda, en el desarrollo de esta tesis doctoral.

A mis directores de tesis, el Dr. José D. Pedreira Andrade y la Dra. Eva Poveda López.

Al Dr. Pedreira, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis, y haber confiado en mí para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Eva Poveda, por haberme introducido en la investigación clínica y haberme guiado durante estos tres años, en la elaboración de esta tesis doctoral. Me gustaría agradecerle especialmente su entusiasmo compartido y sus sabios consejos.

A la Dra. Ángeles Castro, por compartir sus conocimientos, a nivel profesional y especialmente a nivel personal, por escucharme, aconsejarme y por su apoyo constante.

A Fina y Carmen, por su inmensa disposición, facilitándome enormemente el trabajo, siempre con su amable sonrisa.

A todo el Grupo de Virología Clínica, porque con su trabajo y colaboración son un estímulo constante para continuar trabajando en equipo. En especial, a Marta y Andrés por las horas de trabajo compartidas en su compañía.

A Sonia Pértega, por su ayuda en los análisis estadísticos, su paciencia y buen hacer.

A Alex Casal por su inestimable colaboración en cuestiones informáticas.

A todos mis amigos, por su constante apoyo, compartiendo mis alegrías, tristezas y preocupaciones.

Y en especial quisiera dar la gracias a mi familia. A mis padres, por su amor incondicional. A Mentxu por su amistad y por transmitir su alegría, incluso en los momentos más difíciles. A Óscar, por su sinceridad y por estar junto a mí a lo largo de este camino que es la vida, haciéndome sonreír a cada paso.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	11
1.1 Características del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)	12
1.1.1 Estructura del VIH-1	12
1.1.2 Ciclo replicativo del VIH-1	14
1.1.3 Variabilidad genética del VIH-1	16
1.2 Epidemiología de la Infección por VIH	19
1.3 Tratamiento Antirretroviral: Indicaciones de Tratamiento y Fármacos Antirretrovirales Disponibles	21
1.4 Resistencia primaria al tratamiento antirretroviral	23
OBJETIVOS	27
PACIENTES Y MÉTODOS	29
3.1 Población de Estudio	30
3.2 Definiciones de los parámetros evaluados	30
3.3 Análisis estadístico	32
ESTUDIO 1: Características epidemiológicas, virológicas y clínicas de los nuevos diagnósticos de infección por VIH en el noroeste de España en el período 2004-2013	33
ESTUDIO 2: Elevada prevalencia del subtipo F en los nuevos diagnósticos de infección por VIH-1 en el noroeste de España y evidencia de una peor respuesta al tratamiento antirretroviral	44
ESTUDIO 3: Impacto de los blips y los episodios de baja viremia en pacientes VIH+ con supresión virológica con tratamiento antirretroviral	51
DISCUSIÓN	59
7.1 Discusión Estudio I.....	60
7.2 Discusión Estudio II.....	67
7.3 Discusión Estudio III.....	71
CONCLUSIONES	75
BIBLIOGRAFÍA	78
ABREVIATURAS	92
ANEXOS	94
Anexo 1. Publicaciones surgidas de esta tesis	95
Anexo 2. Comunicaciones presentadas en Congresos Internacionales.....	96

Anexo 3. Comunicaciones presentadas en Congresos Nacionales	97
---	----

RESUMEN

Resumen

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) produce un progresivo deterioro del sistema inmunológico que conduce a la aparición de enfermedades definitorias del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) como consecuencia del descenso paulatino en los niveles de linfocitos T CD4+, principal diana del virus [Barré-Sinoussi *et al.* 1983; Popovic *et al.* 1983].

La introducción del tratamiento antirretroviral (TAR) de alta eficacia ha disminuido de manera significativa la morbimortalidad de los pacientes VIH+ convirtiendo a la infección por VIH en una patología crónica. La evolución de la infección en el momento actual y en países con acceso a tratamiento va a estar condicionada por diferentes factores: relacionados con el paciente (e.j. factores epidemiológicos, situación inmunológica, adherencia al tratamiento), con el virus (e.j. carga viral plasmática, presencia de mutaciones de resistencia) o con los fármacos antirretrovirales (e.j. eficacia, tolerabilidad).

Por lo tanto, es importante conocer las características epidemiológicas, clínicas y virológicas en nuestra área sanitaria para establecer y optimizar las estrategias de diagnóstico y manejo clínico de los pacientes con infección por VIH.

En la presente tesis se desarrollan tres estudios:

- **Estudio 1.** Analizó las características epidemiológicas, clínicas e inmunoviroológicas de los nuevos diagnósticos de infección por VIH en el área sanitaria de A Coruña durante el período 2004-2013. La principal vía de transmisión de la infección por VIH fue la sexual, con un aumento de la transmisión entre hombres que tienen sexo con hombres (HSH) en los últimos años. El diagnóstico tardío afecta a la mitad de las nuevas infecciones por VIH, y un tercio de ellas cumplen criterios definitorios de SIDA en el momento del diagnóstico; esta prevalencia ha permanecido estable durante el

periodo de estudio. En cambio, la prevalencia de mutaciones de resistencia a los fármacos antirretrovirales ha disminuido significativamente (de un 10.2% a un 2.6%) en general y para cada una de las familias de fármacos antirretrovirales.

- **Estudio 2.** Evaluó las características genéticas de las variantes de VIH circulantes en nuestra área sanitaria y comparó las características epidemiológicas, inmunoviológicas y la respuesta al TAR entre los dos subtipos genéticos más frecuentes en nuestra población, el subtipo B (65.6 %) y el subtipo F (25.8%). El subtipo F es el subtipo no-B más prevalente entre los nuevos diagnósticos de infección por VIH, a diferencia de lo observado en otras regiones de España o Europa y se transmite principalmente entre HSH. La tasa de supresión virológica fue significativamente menor en los pacientes infectados por el subtipo F del VIH en comparación con los pacientes infectados por el subtipo B (51.7% vs. 85.2%, respectivamente, a las 48 semanas de tratamiento). Se identificaron la infección por subtipo F y tener una carga viral del ARN-VIH > 100.000 copias/mL como factores predictores independientes de una peor respuesta al TAR.
- **Estudio 3.** Evaluó la frecuencia y el impacto de la viremia plasmática de bajo nivel en la cohorte de nuevos diagnósticos de infección por VIH que habían alcanzado la supresión virológica con TAR. Aquellos pacientes con viremia persistente por debajo de los límites de cuantificación de los ensayos comerciales actualmente empleados (20 copias/mL), presentaron un mayor riesgo de fracaso virológico en el seguimiento.

En resumen, los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis han permitido un conocimiento detallado de las características epidemiológicas, clínicas y virológicas de la infección por VIH en nuestra área sanitaria. Entre los principales hallazgos encontrados hay que destacar la alta tasa de diagnósticos tardíos (53.1%), la alta prevalencia del subtipo F (25.8%) y su peor respuesta al TAR en comparación con el subtipo B, y la relevancia de

mantener una viremia plasmática por debajo de los límites de cuantificación y detección de los ensayos actuales (20 copias/mL) para optimizar el control de la infección en el paciente VIH+.

Resumo

A infección polo virus da inmunodeficiencia humana provoca un empeoramento progresivo do sistema inmunolóxico, que leva á aparición de enfermidades definitivas da síndrome de inmunodeficiencia adquirida (a sida) como consecuencia da lenta diminución dos niveis de linfocitos T CD4+, a principal diana do virus [Barré-Sinoussi *et al.* 1983; Popovic *et al.* 1983].

A introdución do TAR de alta eficacia diminuíu de xeito importante a morbilidade e a mortalidade dos pacientes VIH+ polo que a infección polo VIH se converteu nunha enfermidade crónica. A evolución da infección neste momento en países con acceso ao tratamento vai estar condicionada por diferentes factores ora relacionados co paciente (ex.: factores epidemiolóxicos, situación inmunolóxica, adherencia ao tratamento), ora co virus (ex.: carga viral plasmática, presenza de mutacións de resistencia) ou ora cos antirretrovirais (ex.: eficacia, tolerabilidade).

Por tanto, cómpre coñecer as características epidemiolóxicas, clínicas e virolóxicas da infección polo VIH na nosa área sanitaria para establecer e optimizar as estratexias de diagnóstico e manexo clínico dos pacientes con infección polo VIH+.

Nesta tese preséntanse tres estudos:

- **Estudo 1.** Analízanse as características epidemiolóxicas, clínicas e inmunoviolóxicas dos novos diagnósticos de infección polo VIH na área sanitaria da Coruña durante o período 2004-2013. A principal vía de transmisión da infección polo VIH foi a sexual, cun aumento da transmisión entre os homes que teñen sexo con outros homes nos últimos anos. O diagnóstico tardío abrangue a metade das novas infeccións polo VIH, e unha terceira parte delas

teñen criterios definitorios de sida no momento do diagnóstico; esta prevalencia mantívose estable durante o período de estudo. Pola contra, a prevalencia das mutacións de resistencia ás drogas antirretrovirais reduciuse de xeito significativo (dende o 10.2% ao 2.6%) en xeral e para cada unha das familias de drogas antirretrovirais.

- **Estudo 2.** Avalíanse as características xenéticas das variantes do VIH circulantes na nosa área sanitaria e compáranse as características epidemiolóxicas, inmunoviolóxicas e a resposta á terapia antirretroviral entre os dous subtipos xenéticos máis comúns na nosa poboación, o subtipo B (65.6%) e mais o subtipo F (25.8%). O subtipo F é o subtipo non-B máis prevalente entre os novos diagnósticos de infección polo VIH, a diferenza do observado noutras rexións de España ou Europa, e transmítese principalmente entre os homes que teñen sexo con outros homes. A taxa de supresión virolóxica foi significativamente menor nos enfermos infectados polo VIH e subtipo F en comparación cos pacientes con subtipo B (51.7% vs. 85.2%, respectivamente, ás 48 semanas de tratamento). Identificouse a infección polo subtipo F e unha carga viral do ARN-VIH > 100000 copias/mL como factores preditores independentes dunha peor resposta ao TAR.
- **Estudo 3.** Avaliáase a frecuencia e o impacto da viremia plasmática de baixo nivel na cohorte de persoas recentemente infectadas polo VIH que acadaran a supresión virolóxica con TAR. Aqueles pacientes con viremia persistente por baixo dos límites de cuantificación dos ensaios comerciais empregados (20 copias/mL), tiveron un maior risco de fallo virolóxico no seguimento.

En resumo, os resultados obtidos durante o desenvolvemento desta tese permitiron un coñecemento preciso das características epidemiolóxicas, clínicas e virolóxicas da infección polo VIH na nosa área sanitaria. Entre os principais resultados atopados hai que salientar a alta taxa de diagnósticos tardíos (53.1%), a alta prevalencia do subtipo F (25.8%) e a súa peor resposta ao tratamento en comparación co subtipo B, e a importancia de manter a viremia plasmática por debaixo dos límites de cuantificación e detección dos ensaios actuais (20 copias/mL) para optimizar o control da infección no paciente VIH+.

Abstract

Human immunodeficiency virus (HIV) infection causes progressive deterioration of immune system leading to the presence of acquired immunodeficiency syndrome defining-diseases (AIDS) as consequence of a gradual decline of lymphocytes CD4+, main target of the virus [Barré-Sinoussi *et al.* 1983; Popovic *et al.* 1983].

High efficacy antiretroviral treatment (ART) introduction has significantly decreased the morbidity and mortality of HIV+ patients making HIV infection a chronic disease. Nowadays, the course of the infection in countries with access to treatment will be influenced by several factors: related to the patient (i.e. epidemiological factors, immunological status, adherence to treatment), to the virus (i.e. plasma viral load, presence of drug resistance mutations) or to antiretroviral therapy (i.e. efficacy, tolerability).

Therefore, it is important to know epidemiological, clinical and immunovirological characteristics in our medical area to establish and optimize diagnostic strategies and the clinical management of patients with HIV infection.

In this thesis, three studies have been developed:

- **Study 1.** Epidemiological, clinical and immuno-virological characteristics of newly diagnosed HIV patients in the medical area of A Coruña during the period 2004-2013 were analysed. Main route of transmission of HIV infection was sexual route, with an increase between men who have sex with men in the last years. Late diagnosis affects half of newly-HIV infections and a third of these new infections met AIDS-defining criteria at diagnosis time; of note, these prevalences had been stable along the study period. However, the prevalence

of drug resistance mutations have significantly reduced (from 10.2% to 2.6%), globally and for each of the antiretroviral-drug families.

- **Study 2.** Epidemiological and immunovirological characteristics, as well as response to ART, between the two most common genetic subtypes in our population, subtype B (65.6%) and subtype F (25.8%) were compared. Subtype F is the most common non-B subtype between newly-HIV infections that it differs from the prevalence of this subtype observed in other Spanish or European regions. Subtype F is mainly transmitted between men who have sex with men. The rate of virological suppression was significantly lower in HIV-infected patients with subtype F compared to subtype B (51.7% vs. 85.2%, respectively, at 48 weeks of ART). Subtype F and viral load of HIV-RNA > 100.000 copies/mL were identified as independent predictor factors of a poor virological response.
- **Study 3.** Presence and impact of low-level plasma viremia in the cohort of newly diagnosed HIV patients who had achieved virological suppression on ART were assessed. Those HIV patients with persistent viremia below limits of quantification (20 copies/mL) are associated with an increased risk for virological failure during follow-up.

In summary, the results obtained during the developing of this thesis have allowed a detailed knowledge of epidemiological, clinical and immunovirological characteristics of HIV infection in our medical area. Among the major findings should be noted the high rate of late diagnosis (53.1%), high prevalence of subtype F (25.8%) and their worse response to treatment compared to subtype B, and the relevance of maintain

plasma viremia below the limits of quantification and detection of current test (20 copies/mL) to optimize the control of infection in HIV-infected patients.

INTRODUCCIÓN

1.1 Características del Virus de la Inmunodeficiencia Humana

El VIH pertenece a la familia retroviridae, del género lentivirus, y fue identificado en 1983 como el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida o SIDA [Barré-Sinoussi *et al.* 1983; Gallo *et al.* 1983]. La infección por VIH se caracteriza por un deterioro progresivo del sistema inmunológico como consecuencia de un descenso paulatino del nivel de linfocitos T CD4+, principal diana del virus [Barré-Sinoussi *et al.* 1983; Popovic *et al.* 1983]. A medida que evoluciona la infección, el progresivo deterioro del sistema inmunológico favorece la aparición de infecciones por microorganismos patógenos u oportunistas.

1.1.1 Estructura del VIH-1

Morfológicamente, los viriones del VIH son esféricos, con un diámetro de aproximadamente 110 nm. Están rodeados por una envuelta lipídica de origen celular que rodea una cápside icosaédrica viral. Dicha cápside o core contiene a su vez una nucleocápside helicoidal que alberga el material genético del virión (**figura 1**).

La envuelta viral está formada por una bicapa lipídica en la que se insertan las glicoproteínas gp120 y gp41, ambas codificadas por el gen *env* de la envuelta viral. A continuación, se encuentra la matriz formada por la proteína p17 (MA o de la matriz), seguida de la cápside viral formada por la proteína p24 (CA o de la cápside) y estabilizada por la proteína p6. El material genético del virus, formado por dos copias de ácido ribonucleico (ARN), se localiza dentro de la cápside viral en interacción con la proteína p7 (NC o de la nucleocápside). Además, las enzimas esenciales para la replicación viral, la transcriptasa inversa, la proteasa y la integrasa así como las

proteínas reguladoras (Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr y Nef) se encuentran en el interior de la cápside [Emerman *et al.* 1998; Varmus *et al.* 1998; Seelamgari *et al.* 2004].

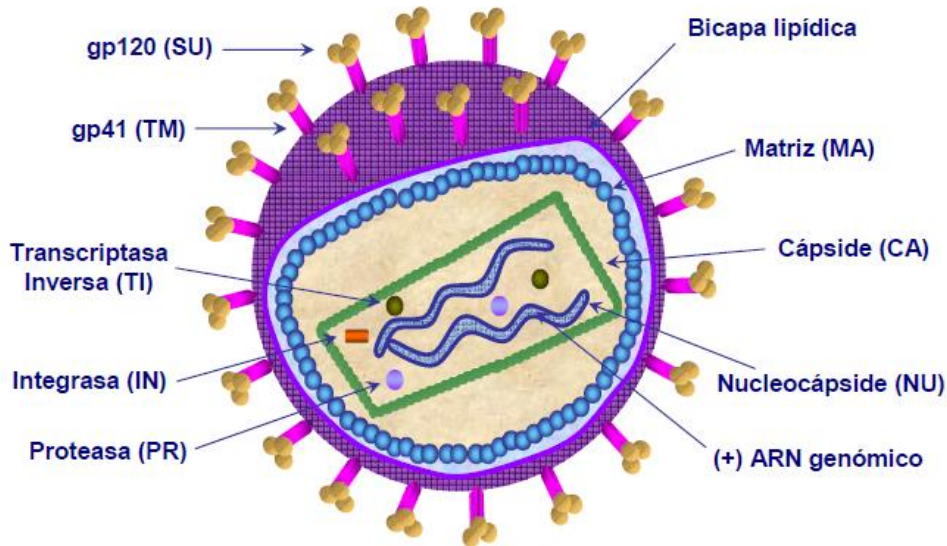


Figura 1. Estructura del virión del VIH-1

El genoma del VIH consiste en una hebra de ARN de aproximadamente 9719 nucleótidos de longitud, lineal, no segmentada, de cadena sencilla y polaridad positiva. En cada partícula vírica hay dos copias idénticas de esta molécula de ARN genómico, cuyos extremos 5' están unidos entre sí por puentes de hidrógeno, lo que hace de la familia de los retrovirus los únicos virus animales cuyo genoma es diploide.

Estructuralmente, el genoma del VIH está formado por tres genes principales (**figura 2**): *gag* y *env* codifican las proteínas estructurales, mientras que *pol* codifica las enzimas virales esenciales para el ciclo replicativo; adicionalmente, 6 genes codifican las proteínas reguladoras (Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr y Vpu). Las secuencias repetidas largas (LTR), no codificantes, flanquean los extremos 3' y 5' del genoma viral, donde se

encuentran regiones reguladoras esenciales para el ciclo replicativo del virus [Karpas *et al.* 2004].

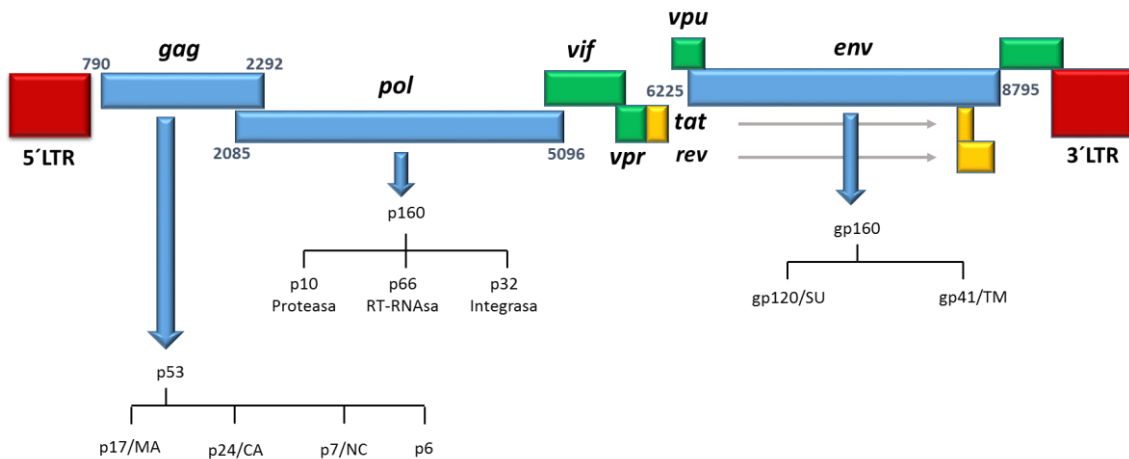


Figura 2. Estructura del genoma del VIH-1.

1.1.2 Ciclo replicativo del VIH-1

El ciclo replicativo del VIH-1 se puede dividir en las siguientes etapas (**figura 3**) [Levy *et al.* 1993]:

- a. **Entrada del virus en la célula diana.** Tras la unión de la glicoproteína de la envuelta gp120 con el receptor celular CD4 y con un receptor celular de quimiocinas, CCR5 o CXCR4.
- b. **Decapsidación.** La unión previa provoca un cambio conformacional en la glicoproteína gp41 que promueve la fusión entre las membranas viral y celular, permitiendo la liberación de la cápside viral en el interior celular, y como consecuencia de ello, la liberación de su material genético.

- c. **Transcripción inversa.** Constituye el procesamiento del genoma viral desde ARN monohebra a ADN bicatenario, también llamado proviral. Esta etapa está catalizada por la enzima viral transcriptasa inversa.
- d. **Integración.** El complejo de preintegración del núcleo se forma en el citosol a partir del ADN viral bicatenario, la integrasa, la transcriptasa inversa, la matriz, Vpr y la proteína celular HMG-1. Este complejo migra al núcleo donde la integrasa inserta el material genético viral en el celular. Tras su integración, el VIH puede permanecer latente, o bien iniciar su replicación masiva, con el consiguiente efecto citopático.

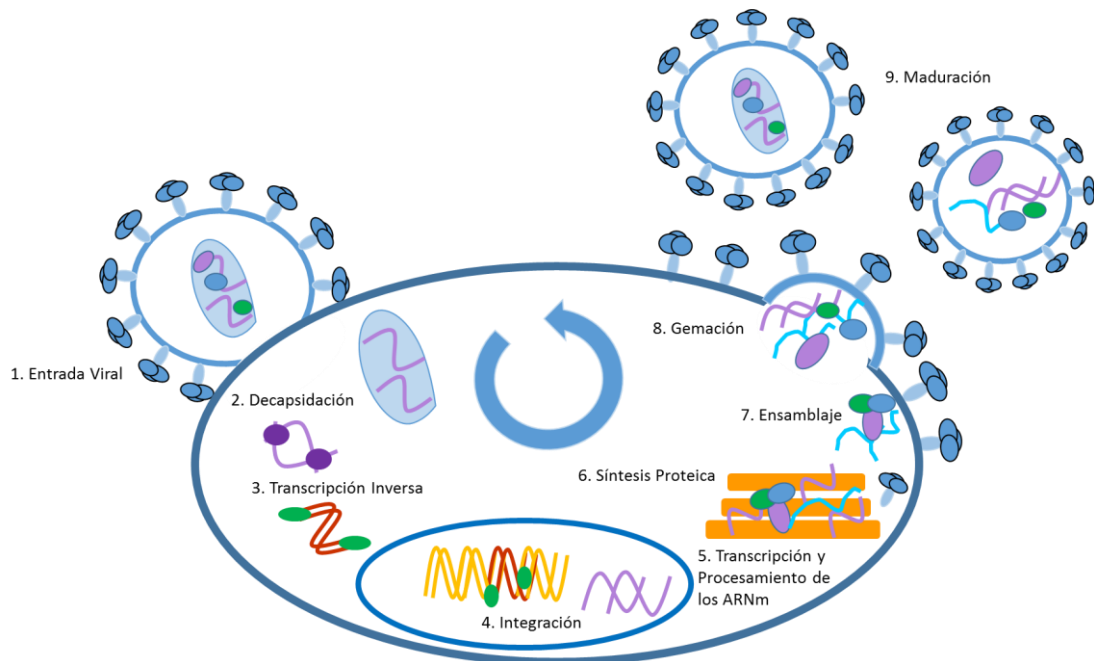


Figura 3. Ciclo replicativo del VIH-1.

- e. **Transcripción de los genes provirales y procesamiento de los transcritos primarios hasta ARN genómico viral y ARN mensajero viral.** A continuación, se

produce la traducción masiva de los ARN mensajero a las distintas proteínas virales en el citoplasma.

- f. **Síntesis, circulación y procesamiento de las proteínas.** En el retículo endoplásmico, se sintetiza la proteína viral *env* (gp160), que produce complejos triméricos (gp41-gp120) que son transportados a la membrana plasmática celular, donde se integran. Las poliproteínas *gag*, y en menor proporción, *gag-pol*, se asocian a la membrana celular a través de la interacción con la cola citoplasmática de gp41.
- g. **Ensamblaje.** Fase en la que las proteínas y moléculas de ARN virales se aproximan a la membrana celular para la formación del virión. Se han descrito afinidades entre algunas de las proteínas virales entre sí y con el ARN genómico viral, aunque la mayor parte de este proceso es aún desconocido.
- h. **Gemación.** Una extensión de la membrana celular que contiene los componentes virales agrupados en la fase anterior se separa del resto de la célula dando lugar al nuevo virión.
- i. **Maduración.** Liberado el virión de la célula infectada se activa la proteasa viral que procesa las proteínas *gag* y *gag-pol*, dando lugar a las proteínas estructurales MA, CA, NC y p6, cuyo reordenamiento formará la partícula viral madura.

1.1.3 Variabilidad genética del VIH-1

La infección por VIH se caracteriza por presentar una amplia variabilidad genética debido, fundamentalmente, a los siguientes mecanismos: la alta tasa de replicación viral ($\sim 10^9$ partículas víricas/día), la alta tasa de error de la transcriptasa inversa que

carece de actividad correctora de copia ($\sim 10^{-4}$ sustituciones por nucleótido copiado) y fenómenos de recombinación genética entre variantes virales que replican dentro de una misma célula [Roberts *et al.* 1988; Robertson *et al.* 1995; Blackard *et al.* 2002; Luft *et al.* 2011]. Estos parámetros explican la gran diversidad genética alcanzada por el VIH en menos de un siglo de evolución epidémica.

Existen dos tipos de VIH, el VIH-1 y el VIH-2, originados por transmisiones zoonóticas independientes. La infección por VIH-2 es más prevalente en África occidental y a nivel mundial afecta aproximadamente a un millón de personas [Rowland-Jones *et al.* 2007; Luft *et al.* 2011]. Se caracteriza por presentar una menor carga viral y una caída de linfocitos T CD4+ más lenta de manera que, los sujetos infectados por VIH-2 se mantienen asintomáticos durante períodos de tiempo muy prolongados. La divergencia genética con el VIH-1 es mayor del 60% para los genes *gag* y *pol* por lo que el diagnóstico y la actividad de los antirretrovirales difieren con respecto al VIH-1 [Luft *et al.* 2011].

La infección por VIH-1 se clasifica, a su vez, en los siguientes grupos: M (major), N (new), O (outlier) y más recientemente grupo P (putative). La infección por VIH-1 del grupo M es la más prevalente en el mundo y a su vez, se divide en nueve subtipos genéticos: A-D, F-H y J-K. Además, se han descrito formas recombinantes circulantes (circulating recombinant forms-CRFs) y formas recombinantes únicas (unique recombinant forms-URFs). Estas variantes son el resultado de la recombinación entre subtipos que han infectado a un mismo individuo y desde el que se han transmitido como tales a otros sujetos. Los CRFs se definen tras ser completamente secuenciados, y ser identificados en tres ó más individuos epidemiológicamente no relacionados. Cuando esto no ocurre, se denominan URFs [Robertson *et al.* 2000; Pasquier *et al.*

2001; Hemelaar *et al.* 2011; Luft *et al.* 2011]. Hasta el momento se han identificado más de 50 CRFs y más de 100 URFs diferentes.

Históricamente, se ha descrito una variabilidad genética del 15-20% dentro del mismo subtipo, mientras que la variación entre subtipos puede ser superior al 30% cuando se analiza la región de la envuelta viral [Robertson *et al.* 2000; Tatt *et al.* 2001; Taylor *et al.* 2008; Hemelaar *et al.* 2011; Luft *et al.* 2011].

La distribución global de los subtipos y formas recombinantes de VIH-1 refleja la complejidad de la epidemiología molecular del VIH. Esta distribución es marcadamente diferente entre las diversas regiones geográficas, aunque los movimientos migratorios poblacionales de las últimas décadas han favorecido la diseminación de los subtipos no-B [Luft *et al.* 2011]. El subtipo C es responsable de casi la mitad de las infecciones por VIH-1 en el mundo (48%), seguido de los subtipos A (12%), B (11%), CRF02_AG (8%), CRF01_AE (5%), G (5%) y D (2%), mientras que los subtipos F, H, J y K son responsables de menos del 1% de las infecciones por VIH a nivel mundial [Hemelaar *et al.* 2011]. Otras formas recombinantes (CRFs y URFs) son responsables del 4% de las infecciones en el mundo [Luft *et al.* 2011].

En Estados Unidos y Europa, la epidemia de VIH surgió en los colectivos de HSH y usuarios de drogas por vía parenteral (UDVP), y está principalmente causada por el subtipo B (> 90% de las infecciones). Sin embargo, en el resto del mundo, la principal vía de transmisión ha sido, y continúa siendo, la transmisión heterosexual, predominando los subtipos no-B [Mastro *et al.* 1997; Hue *et al.* 2005].

La variabilidad genética de la infección por VIH-1 puede impactar desde el punto de vista epidemiológico, de diagnóstico, de evolución clínica de la infección y en la respuesta al tratamiento. Los métodos de diagnóstico y de monitorización,

fundamentalmente la carga viral plasmática, se diseñaron teniendo en cuenta las características genéticas del subtipo B. Pero a medida que se ha ido conociendo la elevada diversidad del virus, estos métodos han sido mejorados incorporando las características de todos los subtipos del VIH [Spira *et al.* 2003; Yirrell *et al.* 2008; De Felipe *et al.* 2011; Vasan *et al.* 2006; Baeten *et al.* 2007; Geretti *et al.* 2009; Martínez-Cajas *et al.* 2009; Hemelaar *et al.* 2011]. Además, diversos estudios han evaluado si los subtipos no-B pueden ser más patogénicos y favorecer una progresión más rápida de la infección o tener una barrera genética más baja al desarrollo de resistencias [Peeters *et al.* 2003; Wainberg *et al.* 2004; Johnson *et al.* 2008; Yirrell *et al.* 2008; Amornkul *et al.* 2013].

1.2 Epidemiología de la Infección por VIH

La infección por VIH continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial, cada año se diagnostican más de 2 millones de nuevas infecciones, y más de 36 millones de personas conviven con esta infección, de los cuales, más de 2.5 millones son niños menores de 15 años [WHO/UNAIDS 2015]. Según la Organización Mundial de la Salud, la tasa de infecciones por VIH para la Unión Europea se sitúa en 5.7 por cada 100000 habitantes. En España, más de 34000 nuevos pacientes se han diagnosticado de infección por VIH desde el año 2003 y en el 2014 se notificaron 3366 nuevos diagnósticos, lo que supone una tasa de 7.25 por cada 100000 habitantes [Ministerio de Sanidad-España, 2015].

La vía de transmisión, varía en función del área geográfica, lo que refleja la diversidad en la epidemiología del VIH en Europa. En España en el año 2014, la transmisión entre HSH fue la vía de transmisión más frecuente (53.9%) seguida de la heterosexual (26%)

y UDVP (4.4%); siendo el 32.1% de los nuevos diagnósticos de infección por VIH de origen extranjero [Ministerio de Sanidad-España, 2015]. A pesar de los esfuerzos preventivos realizados en la última década en Europa, el número de nuevos diagnósticos entre HSH se ha incrementado en un 33% desde el año 2004, representando los jóvenes entre 15 y 24 años el 11% de todos los diagnósticos registrados. No obstante, las medidas preventivas sí han conseguido disminuir el número de nuevas infecciones entre UDVP en un 36%, así como la transmisión vertical y por transfusión sanguínea, siendo actualmente su prevalencia inferior al 1% [HIV/AIDS Surveillance in Europe, 2013].

En Europa, se estima que hasta el 30% de las personas infectadas por VIH desconocen su estado serológico, con una incidencia de diagnóstico tardío (recuento de CD4 inferior a 350 células/ μ L y/o la presencia de una enfermedad definitoria de SIDA al diagnóstico) cercana al 50% de todos los nuevos casos de infección por VIH [Sabin *et al.* 2010]. La alta prevalencia de diagnóstico tardío tiene repercusiones negativas ya que se asocia a mayores tasas de transmisión de la infección, peor respuesta al TAR y mayor riesgo de toxicidad al mismo, menor supervivencia, e incremento de los costes sanitarios [Moreno *et al.* 2010; Sabin *et al.* 2010; Camoni *et al.* 2013]. En España, el 46.2% de las nuevas infecciones por VIH ocurrieron en el contexto de un diagnóstico tardío. Durante el periodo 2009-2014 la tasa de diagnóstico tardío no ha disminuido en ninguna categoría de transmisión, aunque entre HSH es menor que en el resto [Ministerio de Sanidad-España, 2015].

Desde el inicio de la epidemia en España, se han notificado más de 84000 casos de SIDA, de los cuales 444 casos se notificaron en el año 2014; siendo la neumonía por *Pneumocystis jirovecii* y la tuberculosis las enfermedades definitorias de SIDA más

frecuentes, afectando ambas a casi el 25% de los pacientes [Ministerio de Sanidad-España, 2015].

Es importante asegurar un acceso igualitario a todos los grupos de población para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección por VIH, para así poder alcanzar los objetivos del 90% de las personas con infección por VIH diagnosticadas, 90% de las personas diagnosticadas con acceso a los cuidados sanitarios y al tratamiento, y 90% de las personas tratadas con supresión virológica [HIV/AIDS Surveillance in Europe, 2013].

1.3 Tratamiento Antirretroviral: Indicaciones de Tratamiento y Fármacos

Antirretrovirales Disponibles.

La alta eficacia del TAR actual ha permitido convertir a la infección por VIH en una infección crónica en países con acceso al tratamiento [Mocroft *et al.* 1998; Palella *et al.* 1998; ART CC AC, 2008; Cohen *et al.* 2011]. Los objetivos del TAR son disminuir la morbimortalidad asociada a la infección por VIH, la recuperación y preservación de la función inmunológica, evitar el efecto nocivo de la replicación del VIH sobre otras comorbilidades existentes, y evitar la transmisión del VIH [DHHS guidelines, 2015; EACS guidelines, 2015; Documento de consenso de GeSIDA, 2016].

Desde la aparición en 1987 de la zidovudina, el primer fármaco empleado para el tratamiento de la infección por VIH, se han diseñado y finalmente incorporado al arsenal terapéutico para la infección por VIH diferentes familias de fármacos con diferentes características en cuanto a mecanismo de acción, eficacia, toxicidad y barrera genética. En los últimos años han mejorado de forma significativa estas características, de manera que hoy en día disponemos de fármacos altamente eficaces,

con pocos efectos adversos y fáciles de tomar, lo que ha optimizado el manejo del paciente con infección por VIH.

El inicio del TAR debe valorarse siempre individualmente, ofertando al paciente las distintas opciones, adaptando el esquema terapéutico al estilo de vida y comorbilidades del paciente, y valorando el riesgo de mala adherencia [Documento de GeSIDA, 2016].

Las pautas recomendadas para el tratamiento de la infección por el VIH-1 en el momento actual consisten en una combinación de tres fármacos que incluyan dos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN) asociados a un inhibidor de la integrasa (INI), un inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósidos (ITINAN) o un inhibidor de la transcriptasa inversa potenciado (IP/r). Más de 20 fármacos diferentes que pertenecen a 6 familias de fármacos han sido aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) y European Medicines Agency (EMA) para el tratamiento de la infección por VIH [EACS guidelines 2015; DHHS guidelines 2015]. Estas seis familias incluyen:

- **ITIAN:** zidovudina, didanosina, estavudina, lamivudina, emtricitabina y abacavir; además de un análogo de nucleótido, el tenofovir.
- **ITINAN:** nevirapina, efavirenz, etravirina y rilpivirina.
- **IP/r:** atazanavir, darunavir, indinavir, lopinavir, fosamprenavir, saquinavir y tipranavir. Los IP tradicionalmente se potenciaban con dosis bajas de ritonavir, pero recientemente se ha autorizado la potenciación con cobicistat.
- **INI:** raltegravir, elvitegravir (potenciado con cobicistat) y dolutegravir.
- **Antagonistas CCR5:** maraviroc.
- **Inhibidores de la fusión:** enfuvirtida.

El objetivo del TAR es alcanzar y mantener la carga viral plasmática suprimida (ARN-VIH < 50 copias/mL). Las combinaciones de los fármacos antirretrovirales disponibles actualmente, siguiendo las recomendaciones terapéuticas, pueden conseguir la supresión virológica en más del 75% de los casos a las 48 semanas de tratamiento [Documento de consenso de GeSIDA, 2016].

1.4 Resistencia al tratamiento antirretroviral

La alta tasa de replicación del VIH unido a la ausencia de la actividad correctora de errores de la transcriptasa inversa, condiciona la aparición de un elevado número de variantes virales diferentes del VIH en un mismo individuo, denominadas cuasiespecies. Esta capacidad de generar variantes virales tan rápidamente, permite al VIH evadir la presión ejercida por el sistema inmunológico y promover el desarrollo de resistencias a los fármacos antirretrovirales. Es por ello que el beneficio del TAR puede verse comprometido por la presencia o el desarrollo de estas mutaciones, que confieren una pérdida de susceptibilidad a dichos fármacos. Las mutaciones de resistencia pueden adquirirse como consecuencia de la presión selectiva de los fármacos (resistencia adquirida) o bien por la transmisión de variantes virales ya portadoras de mutaciones de resistencia entre personas (resistencia transmitida).

Las guías de tratamiento son las que nos indican las recomendaciones clínicas y técnicas para la realización de los estudios de resistencias. Las resistencias pueden evaluarse mediante herramientas genotípicas o fenotípicas (**Tabla 1**).

Tabla 1. Características de las técnicas para la determinación de resistencia a fármacos en la infección por VIH.

Técnicas	Características
Genotípicas	<p>Análisis, mediante secuenciación del genoma, de las enzimas diana de los fármacos antirretrovirales (transcriptasa inversa, proteasa, integrasa).</p> <p>Sencillo, rápido y accesible.</p> <p>Técnica empleada en la práctica clínica.</p>
Fenotípicas	<p>Análisis directo de la capacidad del virus para infectar células o replicarse dentro de ellas in vitro, en presencia de diferentes concentraciones de fármacos.</p> <p>Proporciona información exacta sobre el grado de resistencia a cada uno de los fármacos analizados.</p> <p>Coste elevado.</p> <p>Laboratorios especializados.</p>

Ambas técnicas comparten limitaciones en especificidad (no detectan poblaciones por debajo del 20%), y sensibilidad (dificultad para su determinación si la carga viral plasmática es < 500-1000 copias/mL) [Tang *et al.* 2012; Wensing *et al.* 2014].

Existe la posibilidad de inferir el resultado fenotípico tras la comparación del resultado del genotipo con la información recogida en amplias bases de datos (fenotipo virtual). Para ello, la interpretación de las mutaciones de resistencia se realiza desde plataformas que se basan en algoritmos que se actualizan periódicamente incorporando las nuevas mutaciones e información sobre las características de las resistencias a los nuevos fármacos antirretrovirales. Algunas de estas plataformas se encuentran disponibles de forma gratuita en diferentes páginas web. Entre las más utilizadas se encuentran: Stanford HIVRT&PR (HIVdb program) [Shafer *et al.* 2008], geno2pheno [Beerenwinkel *et al.* 2003], Retrogram [De Luca *et al.* 2003], Rega [Vercauteren *et al.* 2006] o ANRS [De Luca *et al.* 2004].

La **figura 4** recoge las mutaciones que indican la transmisión de un virus resistente en pacientes naive.

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	I/V	A/M/T/S	L	F	Y	M	I/V	W	C/D/E/F/I/N/S/V/Y	E/N/Q/R
		Ins/del												

ITIAN

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	I/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

Figura 4. Mutaciones de resistencia en pacientes naive (Adaptado de Mendoza et al., 2013).

La prevalencia de resistencias primarias transmitidas en pacientes naive y en países occidentales se ha estabilizado en torno al 8-15% [Vercauteren *et al.* 2009; Wheeler *et al.* 2010; García *et al.* 2011].

Se recomienda realizar un estudio genotípico de resistencias del VIH en las regiones de la transcriptasa inversa y la proteasa en todos los pacientes en el momento del diagnóstico de la infección y antes de iniciar el TAR, si éste se difiere [DHHS guidelines, 2015; Documento de consenso de GeSIDA, 2016]. La resistencia transmitida a INI es excepcional [Stekler *et al.* 2015] por lo que sólo se recomienda estudiar las resistencias basales en la integrasa si existe una sospecha elevada de transmisión de resistencias a

esta familia. Además, se recomienda la realización de un estudio genotípico de resistencias del VIH en todos los pacientes con fracaso virológico confirmado, incluyendo resistencias a la integrasa si el régimen empleado incluye un INI [DHHS guidelines, 2015; Documento de consenso de GeSIDA, 2016].

OBJETIVOS

La introducción del TAR de alta eficacia ha disminuido de manera significativa la morbimortalidad de los pacientes VIH+ convirtiendo a la infección por VIH en una patología crónica. La evolución de la infección en el momento actual y en países con acceso a tratamiento va a estar condicionada por diferentes factores: relacionados con el paciente (e.j. factores epidemiológicos, situación inmunológica, adherencia al tratamiento), con el virus (e.j. carga viral plasmática, presencia de mutaciones de resistencias) o con los fármacos antirretrovirales (e.j. eficacia, tolerabilidad).

Por lo tanto, es importante conocer las características epidemiológicas, clínicas y virológicas en nuestra área sanitaria para establecer y optimizar las estrategias de diagnóstico y manejo clínico de los pacientes con infección por VIH.

En este contexto se desarrolló esta tesis con los siguientes objetivos:

1. Evaluación de las características epidemiológicas, clínicas e inmunoviroológicas de los nuevos diagnósticos de infección por VIH en el área sanitaria de A Coruña en el periodo 2004-2013.
2. Caracterización genotípica de las variantes de VIH-1 circulantes en nuestra área sanitaria: determinación del subtipo genético y análisis de mutaciones de resistencias asociadas con resistencia a fármacos y su impacto en la respuesta al tratamiento.
3. Evaluación de la presencia de niveles bajos de viremia plasmática y su impacto en el fracaso virológico al tratamiento.

PACIENTES Y MÉTODOS

3.1 Población de Estudio

Se identificaron todos los pacientes con nuevo diagnóstico de infección por VIH desde el 1 de enero de 2004 hasta el 31 de diciembre de 2013 en el área sanitaria de A Coruña, que atiende a más de 500.000 habitantes.

Se recogieron, retrospectivamente, las características epidemiológicas (edad, sexo, origen geográfico, fecha de diagnóstico y vía de transmisión de la infección por VIH), clínicas (presencia de enfermedades definatorias de SIDA al diagnóstico, co-infección por hepatitis virales, presencia de enfermedades de transmisión sexual) e inmunoviroológicas (recuento de linfocitos CD4 y carga viral plasmática) en el momento del diagnóstico. Se evaluó la presencia de mutaciones de resistencias primarias a fármacos antirretrovirales y el subtipo genético del VIH-1.

Se realizó el seguimiento clínico de esta cohorte de pacientes hasta el 1 de enero de 2015, registrando durante el seguimiento, el inicio de TAR (fecha de inicio y régimen de TAR utilizado) así como la presencia de supresión virológica y/o fracaso virológico, según las guías de práctica clínica para el manejo del paciente con infección por VIH [DHHS guidelines 2015; EACS guidelines 2015; Documento de consenso de GeSIDA, 2016]. Además, se evaluó la presencia de episodios intermitentes de viremia detectable de bajo nivel en aquellos pacientes que habían alcanzado la supresión virológica.

3.2 Definiciones de los parámetros evaluados

Diagnóstico tardío: recuento de CD4 inferior a 350 células/ μ L y/o la presencia de una enfermedad definatoria de SIDA al diagnóstico.

SIDA: su presencia fue definida según los criterios de los Centers for Diseases Control and Prevention (CDC, USA) como la presencia de un recuento de CD4 inferior a 200 células/ μ L y/o categoría clínica C (**Tabla 1**).

Tabla 1. Enfermedades definatorias de SIDA según los CDC.

<i>Etiología infecciosa</i>
Candidiasis traqueal, bronquial o pulmonar. Candidiasis esofágica.
Coccidiomicosis diseminada (en una localización diferente o además de los pulmones y los ganglios linfáticos cervicales o hiliares).
Criptococosis extrapulmonar.
Criptosporidiasis, con diarrea de más de un mes.
Infección por citomegalovirus de un órgano diferente del hígado, bazo o ganglios linfáticos en un paciente de más de un mes de edad. Retinitis por citomegalovirus.
Infección por virus del herpes simple que cause una úlcera mucocutánea de más de un mes de evolución, o bronquitis, neumonitis o esofagitis de cualquier duración que afecten a pacientes de más de un mes de edad.
Histoplasmosis diseminada (en una localización diferente o además de los pulmones y los ganglios linfáticos cervicales o hiliares).
Isosporidiasis crónica (más de un mes).
Infección por <i>Micobacterium avium-intracellulare</i> o <i>kansasii</i> , diseminada o extrapulmonar. Infección por otras micobacterias, diseminada o extrapulmonar.
Tuberculosis pulmonar. Tuberculosis extrapulmonar o diseminada.
Neumonía por <i>Pneumocystis jiroveci</i> .
Neumonía recurrente.
Leucoencefalopatía multifocal progresiva.
Sepsis recurrente por especies de <i>Salmonella</i> diferente a <i>Salmonella typhi</i> .
Toxoplasmosis cerebral en un paciente de más de un mes de edad.
<i>Etiología neoplásica</i>
Carcinoma de cérvix invasivo.
Sarcoma de Kaposi.
Linfoma de Burkitt o equivalente.

Linfoma Inmunoblástico o equivalente.
Linfoma cerebral primario.
Otros
Encefalopatía por VIH.
Wasting syndrome.

Supresión Viroológica: Carga viral plasmática inferior a 50 copias/mL.

Fracaso Viroológico: Dos determinaciones consecutivas de carga viral plasmática superior a 50 copias/mL tras al menos, 24 semanas, desde el inicio del TAR.

3.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el Paquete estadístico Social Sciences software (SPSS 19.0, Chicago, Illinois, USA). Las variables categóricas se expresaron como número de casos o porcentaje, y fueron comparadas con el test X^2 o test exacto de Fisher, según fuese apropiado. Las variables continuas se expresaron como media \pm desviación estándar, y fueron comparadas con los test no paramétricos de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis, según fuese apropiado, tras evaluar la distribución normal de las distintas variables cuantitativas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó el análisis de regresión logística multivariante para identificar los factores independientemente asociados a la respuesta al TAR. Se emplearon curvas de Kaplan-Meier para evaluar la probabilidad de fracaso virológico durante el seguimiento, y las diferencias entre los grupos se analizaron con los test long-rank y regresión de Cox, calculando el hazard ratio con un intervalo de confianza del 95%. Un valor de p inferior a 0.05 fue considerando estadísticamente significativo para todos los análisis.

ESTUDIO 1:

**Características Epidemiológicas, Viroológicas y Clínicas de los
Nuevos Diagnósticos de Infección por VIH en el Noroeste de
España en el período 2004-2013.**

Resumen:

Se identificaron retrospectivamente todos los pacientes con nuevo diagnóstico de infección por VIH desde el 1 de enero de 2004 hasta el 31 de diciembre de 2013 en el área sanitaria de A Coruña. El objetivo principal de este estudio fue analizar las características clínicas, virológicas e inmunológicas de esta cohorte de pacientes. El objetivo secundario fue la caracterización genotípica del virus: evaluación de los subtipos genéticos de VIH-1 y las mutaciones basales de resistencia en la transcriptasa inversa y la proteasa viral.

Para realizar el análisis genotípico, se amplificaron la proteasa y la transcriptasa inversa a partir de ARN viral extraído de muestras de plasma. Para ello se utilizó el ensayo comercial de TruGene HIV-1 Genotyping Test (Siemens) siguiendo el protocolo específico de este ensayo. A partir de las secuencias obtenidas de la proteasa y de la transcriptasa inversa en formato FASTA se determinó el subtipo genético y la presencia de mutaciones de resistencia utilizando el algoritmo de la base de datos de la Universidad de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/hiv/>). La interpretación de las resistencias primarias transmitidas a inhibidores de la proteasa y de la transcriptasa inversa se realizó siguiendo la Guía de Interpretación de Resistencia a los Antirretrovirales de la Red Española de Investigación en SIDA.

Durante el periodo de estudio, se identificaron 565 nuevas infecciones por VIH. El número de nuevos diagnósticos de infección por VIH aumentó significativamente de 47 casos anuales en el periodo 2004-2008 a 66 casos anuales en el periodo 2009-2013 ($p < 0.001$). La transmisión sexual fue la vía más frecuente de transmisión (82%), con un incremento significativo de la transmisión entre HSH en los últimos cinco años. En el

momento del diagnóstico, el 53.1% de los pacientes VIH+ cumplían criterios de diagnóstico tardío y el 33.6% de SIDA. Estas tasas se mantuvieron estables durante el periodo de estudio.

En cuanto a la caracterización genotípica, el 34.4% de los pacientes estaban infectados por subtipos no-B del VIH-1 siendo el subtipo F el más frecuente, con una prevalencia global del 25.8%. La tasa de transmisión de virus con mutaciones de resistencia a los fármacos antirretrovirales disminuyó de forma global de un 10.2% en el periodo 2004-2008 a un 2.6% en el periodo 2009-2013 ($p = 0.02$). De forma específica, la prevalencia de mutaciones asociadas con resistencia a ITIAN e ITINAN fue del 1.8% y 1.8%, respectivamente y del 0% para los IP/r en el último período.

Los resultados obtenidos en este estudio han sido publicados en “Journal of Medical Virology” en Marzo de 2015. Online ISSN: 1096-9071, Factor de impacto JCR: 2.347

Trends on Epidemiological, Virological, and Clinical Features Among Newly Diagnosed HIV-1 Persons in Northwest Spain Over the Last 10 Years

B. Pernas,¹ A. Mena,¹ A. Cañizares,² M. Grandal,¹ A. Castro-Iglesias,¹ S. Pérttega,³ J.D. Pedreira,¹ and E. Poveda^{1*}

¹Division of Clinical Virology, INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), SERGAS, Universidade da Coruña, A Coruña, Spain

²Service of Microbiology, INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), SERGAS, Universidade da Coruña, A Coruña, Spain

³Clinical Epidemiology and Biostatistics Unit, INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), SERGAS, Universidade da Coruña, A Coruña, Spain

To describe temporal trend and characteristics of newly HIV-diagnosed patients in a medical care area in Northwest Spain over the last 10 years. All newly diagnosed patients for HIV-infection from 2004 to 2013 at a reference medical care area in Northwest of Spain were identified. Epidemiological, virological, immunological, and clinical data, as well as HIV genotype and drug resistance information were recorded. A total of 565 newly HIV-diagnosed patients were identified. The number of new cases increased in the last 5 years (66 cases/year). Overall, 53.1% had a median CD4 counts < 350 cells/ μ l and 33.6% had an AIDS defining criteria. Non-B variants were found in 34.4% of patients being subtype F (25.8%) the most common non-B subtype. The rate of transmitted drug resistance (TDR) over the study period was 3.7%, but a decreased to 2.6% was observed in the last 5 years. The most prevalent TDR mutations were: T215 revertants (1.5%), K219QENR (1.2%), for NRTIs; K103N (1.9%), for NNRTIs; L90M (0.3%), for PIs. Overall, 73.2% of patients started antiretroviral treatment and 9.9% of patients died during follow-up. The number of newly HIV diagnosed patients increased since year 2009. There is a high prevalence of late diagnosis (53%) and 33% had an AIDS defining criteria. Interestingly, the most prevalent non-B subtype in our population was F (25.8%). These findings support the need to facilitate the access for HIV testing to reduce the rate of late HIV diagnosis, improve the clinical outcome and prevent HIV transmission. **J. Med. Virol.**

© 2015 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: newly HIV-diagnoses; late diagnosis; HIV-1 genetic subtype; transmitted drug resistance

INTRODUCTION

HIV infection continues to be an important health problem worldwide. It is estimated that more than 35 million people are living with HIV; more than 2 million new infections are recorded worldwide and 1.5 million people die each year from causes related to HIV infection [WHO/UNAIDS, 2013]. In Spain, a total of 25,731 new HIV patients were notified from 2003, with annual rates per 100,000 populations that vary from 9.8 in 2003 to 12.2 in 2010 [Ministry of Health, Spain, 2013]. With the introduction of highly active antiretroviral therapy (ART), HIV-1 infection is now manageable as a chronic disease in patients who have access to medication and who achieve durable virologic suppression [Palella et al., 1998].

The authors declared that they have no conflict of interest. Grant sponsor: Fondo de Investigación Sanitaria; Grant numbers: CP08/00214; PI10/02166; CM13/00328; PI13/02266.

*Correspondence to: Eva Poveda, Grupo de Virología Clínica, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), As Xubias s/n, A Coruña 15006, Spain. E-mail: eva.poveda.lopez@sergas.es

Accepted 24 January 2015

DOI 10.1002/jmv.24185

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

It is estimated that in Europe, almost 30% of HIV-infected persons still remain undiagnosed with an overall incidence of late presentation around 50% of all HIV cases [Scognamiglio et al., 2013]. These high rates play an important role because late presentation of HIV infection is associated with shorter survival, slow and poor response to treatment, higher frequency of ART toxicity, increased healthcare costs and rates of HIV transmission [Moreno et al., 2010; Sabin et al., 2010; Camoni et al., 2013].

Moreover, other factors may also have an important role in the management of HIV infection. This is the case of the extraordinary genetic variability which characterizes HIV infection with a potential impact on disease progression, diagnosis, therapy, and epidemiology [De Felipe et al., 2011]. HIV epidemic is characterized by a high genotypic diversity and several HIV subtypes and circulating recombinant forms (CRFs) have been described [Waléria-Aleixo et al., 2008; Luft et al., 2011; Scherrer et al., 2011]. HIV-1 subtype B is predominant in North America and Western Europe, including Spain, although is responsible for only 10% of global infections [Luft et al., 2011; Scherrer et al., 2011]. However, the prevalence of HIV-subtypes varies greatly depending on the geographic region, partially because migration produced in the last decade has contributed to the current spread of non-B subtypes in developed countries [De Felipe et al., 2011; Luft et al., 2011]. Although the impact of drug resistance mutations on ART management have been well characterized in HIV-1 subtype B infected patients in the developed world, less data are available regard non-B subtypes [Johnson et al., 2008]. Thus, resistance against antiretroviral drugs in previously untreated HIV patients is of growing relevance. It has been hypothesized that a wide use of antiretroviral drugs could result in an increase in drug-resistant virus transmission and more generally in the prevalence of resistance variants [Sagir et al., 2007]. Overall, the prevalence of TDR varies between 9–24% in Europe and 3–15% in Spain, with the highest TDR rates for both nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) followed by protease inhibitors (PIs) [Sagir et al., 2007; Bracciale et al., 2009; Wittkop et al., 2011; Monge et al., 2012, 2014].

Therefore, to establish the best strategies for HIV diagnosis, prevention and treatment it is important to get a deep knowledge of the characteristics of newly HIV infections in our medical setting. Thus, the objective of this study was to analyze the clinical, virological, and immunological characteristics in a cohort of newly HIV-1 diagnosed patients in the last 10 years. The prevalence of HIV-1 subtypes, drug resistance mutations associated to protease and reverse transcriptase inhibitors and factors associated to clinical outcome (response to ART and mortality) were also evaluated.

J. Med. Virol. DOI 10.1002/jmv

METHODS

All newly diagnosed patients for HIV infection from January 2004 to December 2013 at the medical area of A Coruña, in the northwest of Spain, were recorded. This reference area attends more than 500,000 citizens. Factors included in our analysis were epidemiological and clinical characteristics at diagnosis, immunological and virological status, HIV-1 subtype, and TDR. Characteristics of ART and mortality were also evaluated.

Late diagnosis was defined as CD4 count < 350 cells/mm³ at HIV diagnosis and/or an AIDS-defining event at presentation. The presence of AIDS was defined according to the Centers for Diseases Control and Prevention (CDC) as the presence of CD4 count < 200 cells/mm³ and/or clinic category C.

Resistance testing was performed following the recommendations of HIV treatment guidelines in force at the moment of starting ART. Both HIV protease and reverse transcriptase were amplified from plasma samples using TruGene HIV-1 Genotyping Test (Siemens). FASTA format sequences from the HIV protease and reverse transcriptase were obtained and HIV-1 subtypes were assigned using the freely available algorithm from Stanford University Drug Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu/hiv/>).

The presence of resistance-associated mutations was evaluated following the Antiretroviral Resistance Guidelines, from the Spanish AIDS Research Network, updated in 2013 [De Mendoza et al., 2009a].

This research protocol was approved by the regional ethics committee ("Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia," register code 2013/247).

The statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS 19.0, Chicago, IL). Categorical variables are presented as number of cases or percentage and were compared by the χ^2 test or Fisher's exact test, when appropriate. Continuous variables are expressed as median (interquartile range, IQR) and compared by non-parametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test, when appropriate. Multivariate logistic regression analysis was used to identify factors independently associated with response to ART. Epidemiological characteristics, HIV status at diagnosis and ART regimen were included in univariate analysis but only covariates statistically associated with response to ART in univariate analysis were included in multivariate logistic regression. Cox regression was used to identify factors associated with mortality. Epidemiological characteristics, HIV status at diagnosis and use of ART were included in univariate analysis and covariates statistically associated with mortality in univariate analysis were included in Cox regression. A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.

Newly HIV Infected Patients in Northwest Spain

3

TABLE I. Baseline Characteristics of the Study Population

Variables	N = 565
Demographic-epidemiological	
Male	468 (83%)
Age (years)	37 (30–44)
Routes of HIV transmission	
Heterosexual	228 (43.2%)
MSM	206 (39%)
IDU	93 (17.6%)
Vertical transmission	1 (0.2%)
Nationality	
Spanish	475 (79%)
European	18 (3.2%)
South-American	84 (14.9%)
North-American	2 (0.4%)
Asian	1 (0.2%)
African	13 (2.3%)
HIV status	
Median CD4 (cells/ μ l)	344 (128–550)
CD4 count <350 cells/ μ l	295 (53.1%)
Median RNA-HIV log (copies/ml)	4.98 (4.4–5.4)
Clinical presentation at diagnosis	
No symptoms	363 (66.4%)
Primary infection	36 (6.5%)
Non-AIDS defining disease (clinical category B)	44 (8%)
AIDS defining disease (clinical category C)	105 (19.1%)
Co-infections	
HBsAg positive	12 (2.1%)
Anti-HCV positive	112 (19.9%)
Sexual transmitted diseases	39 (9.1%)

Data are n (%) or median (interquartile range).

RESULTS

Epidemiologic Characteristics

A total of 565 newly HIV diagnosed patients were identified. Table I describes epidemiological, immunological, virological, and clinical characteristics of the study population at the diagnosis time. The number of new HIV-diagnoses increased significantly from 47 cases/year in period 2004–2008 to 66 cases/year in period 2009–2013 ($P < 0.001$). The distribution of new diagnoses per year is shown in Figure 1. The changes in the routes of transmission in the study period are shown in Figure 2. Interestingly, new HIV infections

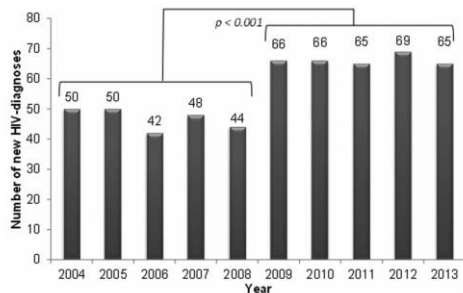


Fig. 1. Distribution of newly HIV diagnosed patients per year of follow-up.

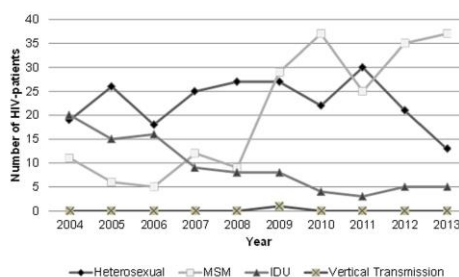


Fig. 2. Distribution of new HIV-diagnoses per routes of transmission and year of diagnosis.

in men who have sex with men (MSM) have showed a great increase in the last 5 years, while a remarkable decrease among heterosexual and intravenously drug users (IDU) is observed since 2011 and 2006, respectively. When comparing 5-year periods 2004–2008 and 2009–2013, a significant decreasing in new HIV infections among heterosexual (50.9% vs. 37.4%) and IDU populations (19% vs. 8.3%) and an increasing among MSM (30.1% vs. 54%) ($P < 0.001$) was observed.

HIV Clinical Status

The median CD4 cell count and plasma HIV-RNA level at the time of HIV-diagnosis were 344 (128–550) cells/ μ l and 4.98 (4.4–5.4) log copies/ml, respectively. Overall, 295 patients (53.1%) of the new HIV infections were late diagnoses and 183 patients (33.6%) of newly-diagnosed HIV patients had an AIDS defining criteria. The prevalence of late diagnosis was stable comparing 5-year periods 2004–2008 and 2009–2013 (56.1% vs. 50.9%, respectively, $P = 0.229$) as well as the percentage of patients with AIDS (35.4% vs. 32.4%, respectively, $P = 0.467$). The most prevalent AIDS defining diseases at diagnosis were: Pneumocystis jiroveci pneumonia (41.3%), tuberculosis (21.1%), lymphoma (5.8%), toxoplasmosis (4.8%), HIV encephalopathy or progressive multifocal leukoencephalopathy (3.8%), wasting syndrome (3.8%), esophageal candidiasis (2.9%), atypical mycobacteria infection (1%), other syndromes (15.5%).

HIV Genotypic Subtypes

The HIV subtype was available for 314 patients (55.6%), of whom 108 subjects (34.4%) were infected with HIV-1 non-B subtypes. Significance increased in the prevalence of non-B subtypes within the last 5 years from 27.8% in 2009 to 41.3% in 2013 has been observed. Subtype F was the most prevalent non-B subtype (25.8%). The HIV subtypes distribution in the study population is shown in Figure 3. Of note, MSM transmission was responsible of 79.2% of newly HIV-patients with subtype F while subtype B

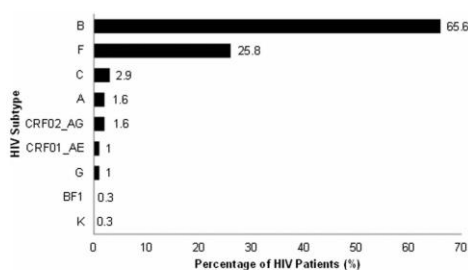


Fig. 3. Distribution of HIV-1 subtypes and CRFs.

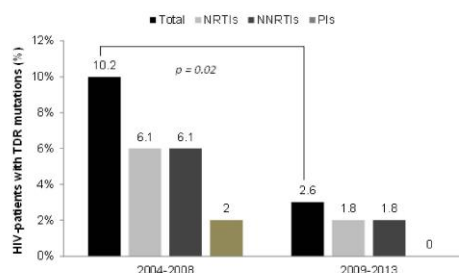


Fig. 4. Rates of TDR mutations in periods 2004–2008 and 2009–2013.

and other non-B/F variants were transmitted by heterosexual (47.3% and 54.2%, respectively) and MSM route (47.3% and 41.7%, respectively). Among the IDU population, new HIV infections corresponded in a 10.1% to subtype B, 1.3% to subtype F and 4.2% to other HIV-variants. Significant differences in the route of transmission between HIV-subtypes were observed ($P < 0.001$).

Transmitted Drug Resistance Mutations

Genotypic resistance testing was performed in 323 patients (58.1%). Table II shows the prevalence of mutations according to the list of TDR identified for treatment-naïve HIV infected patients. The overall prevalence of TDR in this population was 3.7%. The most prevalent TDR mutations were: T215 revertants (1.5%), K219QENR (1.2%), for NRTIs; K103N (1.9%), for NNRTIs; L90M (0.3%), for PIs. Regarding to antiretroviral drug families, the prevalence of TDR mutations was 2.5%, 2.5% and 0.3% for NRTIs, NNRTIs and PIs, respectively. Overall, three patients (0.9%) had TDR mutations only for NRTIs, three

patients (0.9%) for NNRTIs, 1 patient (0.3%) for PIs and five patients (1.6%) had TDR mutations for both NRTIs and NNRTIs. Figure 4 shows the overall prevalence of TDR and by drug class between 2004–2008 and 2009–2013. Decreasing rates of TDR was observed from 10.2% (2004–2008) to 2.6% (2009–2013) in the last 5 years ($P = 0.023$). However, there were no significant differences in the prevalence of mutations specifically associated with NRTIs, NNRTIs or PIs resistance comparing the two 5-year periods but there was a trend to decreasing rates in the last 5 years. Within the last 5 years (2009–2013), the annual prevalence of transmitted drug resistance (NRTIs, NNRTIs, and PIs mutations) was less than 5% and no clear downward trend was observed in this period.

Antiretroviral Treatment and Mortality

Overall, 413 patients (73.2%) started ART. The median of CD4 count at the beginning of ART was 207 (76–317). The regimen of ART was based on: 2 NRTIs + 1 NNRTIs (45.7%); 2 NRTIs + 1 PIs (46.7%);

TABLE II. Prevalence of TDR Mutations in Newly Diagnosed HIV-Infected Patients

NRTIs mutations, n (%)		NNRTIs mutations, n (%)		PIs mutations, n (%)	
M41L	1 (0.3)	L100I	0 (0)	L23I	0 (0)
K65R	1 (0.3)	K101EP	1 (0.3)	L24I	0 (0)
D67EGN	2 (0.6)	K103NS	6 (1.9)	D30N	0 (0)
T69D	1 (0.3)	V106AM	1 (0.6)	V32I	0 (0)
K70ER	0 (0)	V179F	0 (0)	M46IL	0 (0)
L74IV	0 (0)	Y181CIV	0 (0)	I47AV	0 (0)
V75AMTS	0 (0)	Y188CHL	3 (0.9)	G48MV	0 (0)
F77L	0 (0)	G190AES	0 (0)	I50LV	0 (0)
Y115F	1 (0.3)	P225H	0 (0)	F53LY	0 (0)
F116Y	0 (0)	M230IL	0 (0)	I54ALMSTV	0 (0)
Q151M	0 (0)			G73ACST	0 (0)
M184IV	1 (0.3)			L76V	0 (0)
L210W	0 (0)			V82ACFLMST	0 (0)
T215REV ^a	5 (1.5)			N83D	0 (0)
T215YF	0 (0)			I84ACV	0 (0)
K219ENQR	4 (1.2)			I85V	0 (0)
				N88DS	0 (0)
				L90M	1 (0.3)

^aREV:C/D/E/I/N/S/V.

2 NRTIs + integrase inhibitor (5.2%), and other regimens (2.4%). The median time from HIV diagnosis to ART initiation was 3 (1–17) months. Overall, after 48 weeks of ART, 65% achieved undetectable viremia (HIV-RNA < 20 copies/ml). In multivariate analysis, after adjusting for sex, the presence of HIV viral load < 100,000 copies/ml at the time of diagnosis (OR 2.3 [1.3–3.9], $P=0.001$) and heterosexual transmission (OR 2.5 [1.4–4.6], $P=0.007$) were significantly associated with virological response to ART; while PIs regimen was associated with lower virological response (OR 0.5 [0.3–0.8], $P=0.005$).

During follow-up, 56 patients (9.9%) died, and the death occurred during hospitalization at HIV-diagnosis in 18 patients (3.2%). The median time from HIV diagnosis to death was 26 (6–42) months. In multivariate analysis, after adjusting for sex, age (HR 1.04 [1.019–1.065], $P<0.001$) and the presence of an AIDS-defining disease at the time of diagnosis (HR 7.1 [3.5–14.3], $P<0.001$) were significant associated with mortality; regarding the use of ART and mortality, to achieve undetectable viremia (HIV-RNA < 20 copies/ml) was significant associated with a lower risk of mortality (HR 0.04 [0.02–0.1], $P<0.001$).

DISCUSSION

This study evaluates the characteristics of a large cohort of newly HIV diagnosed patients in Northwest of Spain in the last 10 years. A significant increase in the number of new HIV diagnosed patients was observed, from 47 cases/year in period 2004–2008 to 66 cases/year in the last 5 years. HIV epidemic affects mainly young (median age of 37 years) male (83%) being sexual transmission the main route of infection (82%). In the last 10 years, intravenous drug users have become a secondary route of transmission while a significant predominance of HIV infection among MSM has been observed. The increase in new HIV-infections observed in our population could be related to the high prevalence of MSM since year 2009, similarly to the significant increase on the HIV prevalence among MSM described in Europe and North America [Van Griensven et al., 2009; WHO/UNAIDS, 2013]. Moreover, high-risk sexual behavior among MSM described in recent years, as well as MSM are more likely to get tested for HIV might explain the increase in new HIV-infections in the last 5 years [Camoni et al., 2013; Fernández-Dávila et al., 2013].

High rates of late HIV diagnosis was observed in our study population since half of them (53.1%) had CD4 counts < 350 cells/ μ l and 33.6% had an AIDS defining criteria at the time of diagnosis. Reducing late HIV diagnosis is considered a public health priority and continues to be a great challenge in most countries [Phillips et al., 2007; Palacios et al., 2008; Dolpech et al., 2013; Shen et al., 2013]. To gain this goal, the US CDC and the US Preventive Services Task Force (USPSTF) newly recommended one-time

HIV testing for persons aged 15–65 at least once as part of routine health care [Branson et al., 2006; Moyer, 2013]. In Spain, HIV testing is generally performed in case of risk behavior or clinical suspicion, but is not incorporated as a routine screening. The high proportion of late presenters at HIV diagnosis observed in our study is similar to that reported in other European countries and in Spain [European Centre for Disease Prevention and Control, 2010; Palacios et al., 2008]. Of note, the rate of late HIV diagnosis (CD4 counts < 350 cells/ μ l) and AIDS events was stable during all the study period. Therefore, it is critical to identify the characteristics of new HIV infections to establish optimal strategies for prevention and earlier HIV diagnosis [Camoni et al., 2013; Loconsole et al., 2013].

The identification of HIV-1 subtypes allows us to know the dynamics of HIV molecular epidemiology and different transmission or disease progression rates have been suggested [Zhang et al., 2010; Hemelaar et al., 2011]. Broad distribution of HIV-1 subtypes worldwide has been stable over time, with a prevalence for subtype B of more than 90% in Western Europe and the United States [Hemelaar et al., 2011; Luft et al., 2011]. However, the prevalence of non-B subtypes in Europe has increased during the last two decades and is mainly related to population movements. Although non-B subtypes were more common in people of non-Caucasian origin, their estimated prevalence in some European countries is more than 15% in Caucasians; similarly, in native Spaniards, the rate of non-B subtypes increased from 1.5% in 2000–2002 to 11% in 2007–2010 [Bracciale et al., 2009; Treviño et al., 2011; Monge et al., 2012; Abecasis et al., 2013; Chaix et al., 2013].

The prevalence of non-B subtypes observed in our population (34%) is much higher than the prevalence described in other Spanish cohorts as the Spanish AIDS Research Network Cohort-CoRIS (15.9%) and with a HIV subtypes distribution also different. While the rates of CRFs account for almost 10% of all HIV infections in Spain, being CRF02_AG the most common non-B variant with a prevalence of 40% in Madrid [De Mendoza et al., 2009b; Treviño et al., 2011; Monge et al., 2012], the prevalence of CRFs in our population is much lower (3%). Instead, subtype F, that causes less than 1% of infections worldwide and 1.6% of newly HIV-diagnoses in CoRIS, affects one in four of the newly HIV-diagnosed patients in our study [Hemelaar et al., 2011; Luft et al., 2011; Monge et al., 2012]. The prevalence reported for subtype F varies between different geographic regions and overall is less than 5% but there are some exceptions. In Brazil, subtype F accounts for approximately 10–20% of non-B virus infection [Dias et al., 2009; Hemelaar et al., 2011]. Moreover, Romania has the highest prevalence described (>70%) due to parenteral transmission in children in the late 1980s [Apetrei et al., 1998]. This association with

demographic parameters suggests highly compartmentalized epidemics, determined by social and behavioral characteristics of the patients [Abecasis et al., 2013].

Observational evidence suggests that non-B subtypes are more able to transmit by the heterosexual route [Yirell et al., 2008; Lai et al., 2012]. In fact, it has been recently described the spread of subtype F among Italian heterosexual men and up to 68% of the subtype F Brazilian patients were women being infected by heterosexual route [Monteiro et al., 2009; Lai et al., 2012]. However, subtype F is mainly transmitted by homosexual route in our study (79.2%). Indeed, a rapid expansion of subtype F among MSM in Galicia was reported in HIV newly diagnosed patients during 2010–2011 and the phylogenetic analyses traced the ancestry of this cluster in Brazil, where the prevalence of subtype F is also high [Thomson et al., 2012]. The recognition of a high prevalence of subtype F in our population might be an important issue since more rapid disease progression, lower genetic barrier to drug resistance and different response to antiretroviral therapy among non-B subtypes has been described [Yirell et al., 2008; Chaix et al., 2013; Pernas et al., 2014].

HIV treatment guidelines recommend performing an HIV drug resistance testing for all subjects beginning treatment [EACS, 2013; DHHS 2014]. Transmission of drug-resistant HIV variants is well documented and is associated with suboptimal virologic response to first-line antiretroviral treatment, limiting the therapeutic options [Sagir et al., 2007; Bracciale et al., 2009]. Overall, the prevalence of TDR varies between 9–24% in Europe and 3–15% in Spain [Wittkop et al., 2011; Monge et al., 2012, 2014]. While a stable or declining prevalence of TDR was detected in some studies, others showed an increase in TDR prevalence [Sagir et al., 2007; Monge et al., 2012; Rodriguez-Rodriguez et al., 2013]. Overall, a significant decrease in TDR was observed from 10.2% at period 2004–2008 to 2.6% at period 2009–2013.

In Spain, the TDR rate for NNRTIs has decreased from 5.2% in 2007 to 2.8% in 2011 in naive patients, but not for TDR associated with both NRTIs and PIs [Monge et al., 2012, 2014]. In our population, during the last 5 years it has been observed a decrease in the rates of TDR for NRTIs (6.1% in 2004–2008 to 1.8% in 2009–2013), NNRTIs (6.1–1.8%) and PIs (2–0%) (Fig. 4). Moreover, in the CoRIS cohort, patients infected by non-B subtypes were at 73% of lower risk of having resistance to the NRTIs class [Waléria-Aleixo et al., 2008; Monge et al., 2012]. It has been proposed that changing features in the HIV-1 epidemic in European countries, characterized by a significant increase in non-B subtypes from populations migrating from countries with more limited access to ART, may partially justify the finding of a reduced prevalence of some TDR during the last years [Bracciale et al., 2009; De Mendoza et al., 2009b].

J. Med. Virol. DOI 10.1002/jmv

This low prevalence of TDR may influence treatment and diagnostic recommendations in the near future. In fact, some experts have suggested that might not be necessary to perform a baseline PIs resistance test, and only evaluate the presence of TDR for NNRTIs could be more cost-effective in Spain [Monge et al., 2012, 2014] given the cost-benefit for performing genotypic studies in naive patients have been established for a TDR prevalence above 5% [Sax et al., 2005]. This could be an interesting approach in our population because the global prevalence of TDR is 3.7% with a significant decrease in the last 5 years with a trend toward decreasing rates of NRTIs, NNRTIs, and PIs resistance.

Although some of our results are similar to those described in other studies, specific characteristics of our population, as the high prevalence of subtype F, could not be extrapolated to other regions in Spanish or European countries. These different features may have important implications in our daily clinical practice for the management of HIV-infected patients. One of the limitations of our study is the lack of the protease and reverse transcriptase sequences for all the study population and therefore the impossibility to determine the HIV subtype, particularly in the period 2004–2008 when to perform a genotypic HIV resistance test prior ART initiation was not mandatory [Vandamme et al., 2004; Recommendations from GESIDA, 2007].

In summary, new HIV infections increased in the last 5 years in the Northwest of Spain with a high prevalence of late diagnosis and AIDS events. These data highlights the need for a more active HIV testing in our population to promote early HIV diagnosis. Moreover, there is a high prevalence of subtype F in newly HIV diagnosed patients, being MSM the main route of transmission. These findings might be highly relevant for the clinical management of these patients and to establish the most optimal strategies for prevention and diagnosis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (CP08/00214, PI10/02166, CM13/00328, PI13/02266), and Fundación Profesor Novoa Santos, A Coruña. We would like to thank Biobank of A Coruña (SERGAS) for providing us the technical, ethical, and legal advice necessary for the development of our research.

REFERENCES

- Abecasis AB, Wensing AM, Paraskevis D, Vercauteren J, Theys K, Van der Vijver DA, Albert J, Asjö B, Balotta C, Beshkov D, Camacho RJ, Clotet B, De Gascun C, Griskevicius A, Grossman Z, Hamouda O, Horvan A, Kolupajev T, Korn K, Kostrikis LG, Kucherer C, Lämsola K, Linka M, Nielsen C, Otelea D, Paredes R, Poljak M, Puchhammer-Stöckl E, Schmit JC, Sönnnerborg A, Stankova D, Stanojevic M, Struck D, Boucher CA, Vandamme AM. 2013. HIV-1 subtype distribution and its demographic determinants in newly diagnosed patients in Europe suggest highly compartmentalized epidemics. *Retrovirology* 10:7.

Newly HIV Infected Patients in Northwest Spain

7

- Apetrei C, Necula A, Holm-Hansen C, Lousseret-Ajaka I, Pandrea I, Cozmei C, Streinu-Cercer A, Pascu FR, Negut E, Molnar G, Duca M, Pesece M, Brun-Vézinet F, Simon F. 1998. HIV diversity in Romania. *AIDS* 12:1079–1085.
- Bracciale L, Colafigli M, Zazzi M, Corsi P, Meraviglia P, Micheli V, Maserati R, Gianotti N, Penco G, Setti M, Di Giambenedetto S, Butini L, Vivarelli A, Trezzi M, De Luca A. 2009. Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance in HIV-1 infected patients in Italy: Evolution over 12 years and predictors. *J Antimicrob Chemother* 64:607–615.
- Branson BM, Handsfield HH, Lampe MA, Janssen RS, Taylor AW, Lyss SB, Clark JE, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2006. Revised recommendations for HIV testing of adults, adolescents, and pregnant women in health-care settings. *MMWR Recomm Rep* 55:1–17.
- Camoni L, Raimondo M, Regine V, Salfa MC, Suligoi B, regional representatives of the HIV Surveillance System. 2013. Late presenters among persons with a new HIV diagnosis in Italy, 2010–2011. *BMC Public Health* 13:281.
- Chaix ML, Seng R, Frange P, Tran L, Avettand-Fenoël V, Ghosn J, Reynes J, Yazdanpanah Y, Raffi F, Goujard C, Rouzioux C, Meyer L, ANRS PHIMO Cohort Study Group. 2013. Increasing HIV-1 non-B subtype primary infections in patients in France and effect of HIV subtypes on virological and immunological responses to combined antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 56:880–887.
- De Felipe B, Pérez-Romero P, Abad-Fernández M, Fernández-Cuenca F, Martínez-Fernández FJ, Trastoy M, Mata R, del C, López-Cortés LF, Leal M, Viciano P, Vallejo A. 2011. Prevalence and resistance mutations of non-B HIV subtypes among immigrants in southern Spain along the decade 2000–2010. *Virology* 8:416.
- De Mendoza C, Anta L, García F, Pérez-Eliás MJ, Gutiérrez F, Llibre JM, Menéndez-Arias L, Dalmau D, Soriano V. 2009a. HIV-1 genotypic drug resistance interpretation rules—2009 Spanish Guidelines. *AIDS Rev* 11:39–351.
- De Mendoza C, Garrido C, Poveda E, Corral A, Zahonero N, Treviño A, Anta L, Soriano V. 2009b. Changes in drug resistance patterns following the introduction of HIV type 1 non-B subtypes in Spain. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25:967–972.
- PHHS. 2014. Panel on antiretroviral guidelines for adults and adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1 infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services. Available at <http://aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>.
- Dias CF, Nunes CC, Freitas IO, Lamego IS, Oliveira IM, Gilli S, Rodrigues R, Brigido LF. 2009. High prevalence and association of HIV-1 non-B subtype with specific sexual transmission risk among antiretroviral naïve patients in Porto Alegre, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 51:191–196.
- Dolpech V, Brown AE, Croxford S, Chau C, Polavarapu V, Cooper N, Rooney G, Yin Z. 2013. Quality of HIV care in the United Kingdom: Key indicators for the first 12 months from HIV diagnosis. *HIV Med* 14:19–24.
- EACS. 2013. European AIDS Clinical Society. Guidelines version 7.0 October 2013. Available at http://www.eacsociety.org/Portals/0/Guidelines_Online_131014.pdf.
- European Centre for Disease Prevention and Control. 2010. European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe: HIV/AIDS surveillance in Europe 2009. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control. 2010.
- Fernández-Dávila P, Folch C, Ferrer L, Soriano R, Diez M, Casabona J. 2013. Who are the men who have sex with men in Spain that have never been tested for HIV? *HIV Med* 14:44–48.
- Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanow S, WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization. 2011. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. *AIDS* 25:679–689.
- Johnson VA, Brun-Vézinet F, Clotet B, Gunthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro JM, Richman DD, International AIDS Society-USA Drug Resistance Mutations Group. 2008. Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Top HIV Med* 16:138–145.
- Lai A, Simonetti F, Zehender G, De Luca A, Micheli V, Meraviglia P, Corsi P, Bangarelli P, Almi P, Zoncada A, Paolucci S, Gonnelli A, Colao G, Tacconi D, Franzetti M, Ciccozzi M, Zazzi M, Balotta C. 2012. HIV-1 subtype F1 epidemiological networks among Italian heterosexual males are associated with introduction events from South America. *PLoS ONE* 7:e42223.
- Loconsole D, Procacci R, Sallustio A, Quarto M, Germinario C, Chironna M, HIV Regional Coordinators. 2013. Surveillance of new HIV infections/diagnoses in Puglia Region (South Italy), years 2007–2011. *Ann Ig* 5:291–298.
- Luft LM, Gill MJ, Church DL. 2011. HIV-1 viral diversity and its implications for viral load testing: Review of current platforms. *Int J Infect Dis* 15:e661–e670.
- Ministry of Health, Social Services and Equality. 2013. HIV/AIDS surveillance, Spain. Update June 30th 2013. Sistema de información sobre nuevos diagnósticos de VIH. Registro Nacional de casos de SIDA.
- Monge S, Guillot V, Alvarez M, Peña A, Viciano P, García-Bujalance S, Pérez-Eliás MJ, Iribarren JA, Gutiérrez F, Itziar Casado M, García M, CoRIS. 2012. Analysis of transmitted drug resistance in Spain in the years 2007–2010 documents decline in mutations to the non-nucleoside drug class. *Clin Microbiol Infect* 18:E485–E490.
- Monge S, Guillot V, Alvarez M, Chueca N, Stella N, Peña A, Delgado R, Córdoba J, Aguilera A, Vidal C, García F, CoRIS. 2014. Clinically relevant transmitted drug resistance to first line antiretroviral drugs and implications for recommendations. *PLoS ONE* 9:e90710.
- Monteiro JP, Alcantara LC, De Oliveira AM. 2009. Genetic variability of human immunodeficiency virus-1 in Bahia State, Northeast, Brazil: High diversity of HIV genotypes. *J Med Virol* 81:391–399.
- Moreno S, Mocroft A, D'Amico A. 2010. Medical and societal consequences of late presentation. *Antivir Ther* 15:9–15.
- Moyer VA, U. S. Preventive Services Task Force. 2013. Screening for HIV: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Ann Intern Med* 159:51–60.
- Palacios R, Viciano I, Pérez de Pedro I, de la Torre I, Roperio J, Fernández F, Salgado S, Roldán F, de Dios J, Colmenero J, Márquez M, Santos J, Grupo Malagueño para el Estudio de las Enfermedades Infecciosas. 2008. Prevalencia de mutaciones de resistencia primaria en los nuevos diagnósticos de infección por el VIH en la provincia de Málaga. *Enferm Infect Microbiol Clin* 26:141–145.
- Pallela FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD. 1998. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 338:853–860.
- Pernas B, Grandal M, Mena A, Castro-Iglesias A, Cañizares A, Wyles DL, López-Calvo S, Pértiga S, Rodríguez-Osorio I, Pedreira JD, Poveda E. 2014. High prevalence of subtype F in newly diagnosed HIV-1 persons in northwest Spain and evidence for impaired treatment response. *AIDS* 28:1837–1840.
- Phillips AN, Gazzard B, Gilson R, Easterbrook P, Johnson M, Walsh J, Leen C, Fisher M, Orkin C, Anderson J, Pillay D, Delpech V, Sabin C, Schwenk A, Dunn D, Gompels M, Hill T, Porter K, Babiker A, UK Collaborative HIV Cohort Study. 2007. Rate of AIDS diseases or death in HIV-infected antiretroviral therapy-naïve individuals with high CD4 cell count. *AIDS* 21:1717–1721.
- Recommendation from the GESIDA/Spanish AIDS Plan regarding antiretroviral treatment in adults with human immunodeficiency virus infection (update January 2007). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 25:32–53.
- Rodríguez-Rodríguez N, Duran A, Bouzas MB, Zapiola I, Vila M, Indyk D, Bissio E, Salomon H, Dilernia DA. 2013. Increasing trends in primary NNRTI resistance among newly HIV-1 diagnosed individuals in Buenos Aires, Argentina. *J Int AIDS Soc* 16:18519.
- Sabin CA, Schwenk A, Johnson MA, Gazzard B, Fisher M, Walsh J, Orkin C, Hill T, Gilson R, Porter K, Easterbrook P, Delpech V, Bansi L, Leen C, Gompels M, Anderson J, Phillips AN, UK Collaborative HIV Cohort (UK CHIC) Steering Committee. 2010. Late diagnosis in the HAART era: Proposed common definitions and associations with mortality. *AIDS* 24:723–7727.
- Sagir A, Oette M, Kaiser R, Däumer M, Fätkenheuer G, Rockstroh JK, Knechten H, Schmutz G, Hower M, Emmelkamp J, Pfister H, Häussinger F, RESINA Study Team. 2007. Trends in prevalence of primary HIV drug resistance in Germany. *J Antimicrob Chemother* 60:843–848.

- Sax PE, Islam R, Walensky RP, Losina E, Weinstein MC, Goldie SJ, Sadownik SN, Freedberg KA. 2005. Resistance testing be performed for treatment-naive HIV-infected patients? A cost-effectiveness analysis. *Clin Infect Dis* 41:1316–1326.
- Scherer AU, Ledergerber B, von Wyl V, Böni J, Yerly S, Klimkait T, Bürgisser P, Rauch A, Hirschel B, Cavassini M, Elzy L, Vernazza PL, Bernasconi E, Held L, Günthard HF, Swiss HIV Cohort Study. 2011. Improved virological outcome in White patients infected with HIV-1 non-B subtypes compared to subtype B. *Clin Infect Dis* 53:1143–1152.
- Scognamiglio P, Chiaradia G, De Carli G, Giuliani M, Mastroianni CM, Aviani Barbacci S, Buonomini AR, Grisetti S, Sampaolesi A, Corpolongo A, Orchi N, Puro V, Ippolito G, Girardi E, SENDH Study Group. 2013. The potential impact of routine testing of individuals with HIV indicator diseases in order to prevent late HIV diagnosis. *BMC Infect Dis* 13:473.
- Shen Y, Lu H, Wang Z, Qi T, Wang J. 2013. Analysis of the immunologic status of a newly diagnosed HIV positive population in China. *BMC Infect Dis* 13:429.
- Thomson MM, Fernández-García A, Delgado E, Vega Y, Díez-Fuertes F, Sánchez-Martínez M. 2012. Rapid expansion of a HIV-1 subtype F cluster of recent origin among men who have sex with men in Galicia, Spain. *J Acquir Immune Defic Syndr* 59:e49–e51.
- Treviño A, Soriano V, Rodríguez C, Arredondo M, Rivas P, Herrero-Mendoza D, Parra P, del Romero J, Anta L, Puente S, de Mendoza C. 2011. Changing rate of non-B subtypes and coinfection with hepatitis B/C viruses in newly diagnosed HIV type 1 individuals in Spain. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27:633–638.
- Van Griensven F, de Lind van Wijngaarden JW, Baral S, Grulich A. 2009. The global epidemic on HIV infection among men who have sex with men. *Cur Opin HIV AIDS* 4:300–307.
- Vandamme AM, Sonnerborg A, Ait-Khaled M, Albert J, Asjo B, Bachelier L, Banhegyi D, Boucher C, Brun-Vézinet F, Camacho R, Clevenbergh P, Clumeck N, Dedes N, De Luca A, Doerr HW, Faudon JL, Gatti G, Gerstoft J, Hall WW, Hatzakis A, Hellmann N, Horban A, Lundgren JD, Kempf D, Miller M, Miller V, Myers TW, Nielsen C, Opravil M, Palmisano L, Perno CF, Phillips A, Pillay D, Pumarola T, Ruiz L, Salminen M, Schapiro J, Schmidt B, Schmit JC, Schuurman R, Shulse E, Soriano V, Staszewski S, Vella S, Youle M, Ziermann R, Perrin L. 2004. Updated European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing. *Antivir Ther* 9:829–848.
- Waléria-Aleixo A, Martins AN, Arruda MB, Brindeiro RM, Da-Silva RM, Nobre FF, Greco DB, Tanuri A. 2008. Drug resistance mutation profile and accumulation kinetics in human immunodeficiency virus-positive individuals infected with subtypes B and F failing highly active antiretroviral therapy are influenced by different viral codon usage patterns. *Antimicrob Agents Chemother* 52:4497–4502.
- WHO/UNAIDS. 2013. Global Report. UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013. WHO/UNAIDS. Available at http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf.
- Wittkop L, Günthard HF, 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, Garcia F, Judd A, Porter K, Thiébaud R, Castro H, van Sighem AI, Colin C, Kjaer J, Lundgren JD, Paredes R, Pozniak A, Clotet B, Phillips A, Pillay D, Chêne G, 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* 11:363–371.
- Yirrell DL, Shaw L, Campbell E, Burns SM, Cameron SO, Goldberg D. 2008. HIV subtypes in Scotland, 2000–2006. *Epidemiol Infect* 136:1069–1075.
- Zhang M, Foley B, Schultz AK, Macke JP, Bulla I, Stanke M, Morgenstern B, Korber B, Leitner T. 2010. The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic. *Retrovirology* 7:25.

ESTUDIO 2:

Elevada Prevalencia del Subtipo F en los Nuevos Diagnósticos de Infección por VIH-1 en el Noroeste de España y Evidencia de Peor Respuesta al Tratamiento Antirretroviral.

Resumen:

El subtipo F es el subtipo no-B más frecuente en nuestra población, con una prevalencia del 25.8% en los nuevos diagnósticos de infección por VIH en nuestro medio en el período 2004-2013. El objetivo de este estudio fue evaluar las características diferenciales entre los subtipos genéticos más prevalentes en nuestra población, el subtipo B y el subtipo F, y analizar la respuesta al TAR en función del subtipo genético.

Para ello, en la cohorte de nuevos diagnósticos de infección por VIH en el área sanitaria de A Coruña, se seleccionaron los pacientes diagnosticados en el periodo 2009-2013, periodo en el que se había realizado un estudio de resistencias basal a la mayoría de los pacientes, y por tanto, fue posible determinar el subtipo genético de VIH-1 a partir de las secuencias FASTA de transcriptasa inversa y proteasa. Se realizó un análisis comparativo de las características epidemiológicas, clínicas e inmunoviroológicas al diagnóstico, y se evaluó la respuesta al TAR a las 24, 48 y 96 semanas.

Los pacientes infectados con el subtipo F eran varones (97.1%), con predominio en el colectivo de HSH comparado con los pacientes infectados con el subtipo B (81.8% vs. 45.8%, $p < 0.001$). No hubo diferencias en cuanto a la nacionalidad, siendo mayoritariamente españoles todos los pacientes en ambos grupos. Tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto a la presencia de enfermedades definitorias de SIDA al diagnóstico (24.2% en el subtipo F vs. 35% en el subtipo B) y el porcentaje de pacientes con $CD4 < 350$ células/ μ L al diagnóstico fue similar (42.6% y 50.3% para los subtipos F y B respectivamente). Sin embargo, los niveles de ARN-VIH

en plasma en el momento del diagnóstico fueron significativamente más elevados en los pacientes con subtipo F (5.3 vs. 4.9 log copias/mL, $p = 0.002$). La tasa de mutaciones de resistencia transmitida a fármacos fue del 4.2% pero solo se encontraron resistencias en las secuencias de subtipo B.

Tras el diagnóstico, el 80.8% de los pacientes con subtipo F y el 72.7% de los pacientes con subtipo B iniciaron TAR, sin observarse diferencias en cuanto al régimen de TAR iniciado. Se definió la supresión virológica como niveles de ARN-VIH < 50 copias/mL. Las tasas de respuesta virológica del subtipo F fueron del 31%, 51.7% y 61.1% a las 24, 48 y 96 semanas respectivamente, frente a una tasa de supresión virológica del 78.3%, 85.2% y 94.3% para el subtipo B, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$ a las 24 y 48 semanas; y $p = 0.015$ a las 96 semanas).

En el análisis multivariado, la infección por el subtipo F del VIH (OR 14.8 [IC 95% 2.5-16.7], $p < 0.001$) y tener una carga viral elevada al diagnóstico (OR 11.4 [IC 95% 1.7-17.9], $p = 0.001$) se identificaron como predictores independientes de peor respuesta virológica a las 24 semanas de tratamiento.

Los resultados obtenidos en este estudio han sido publicados en “AIDS” en Julio de 2014. Online ISSN: 1473-5571, Factor de Impacto JCR: 6.407.

Correspondence to Jorge Parra-Ruiz, MD, PhD, Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario San Cecilio, Avda. Dr Olóriz 16, 18012 Granada, Spain.
Tel: +34 958 023 104; fax: +34 958 249 079;
e-mail: jordl@ugr.es

Received: 23 February 2014; revised: 15 April 2014;
accepted: 16 April 2014.

References

- Perez-Valero I, Arribas JR. Protease inhibitor monotherapy. *Curr Opin Infect Dis* 2011; **24**:7–11.
- Arribas JR, Horban A, Gerstoft J, Fatkenheuer G, Nelson M, Clumeck N, et al. The MONET trial: darunavir/ritonavir with or without nucleoside analogues, for patients with HIV RNA below 50 copies/ml. *AIDS* 2010; **24**:223–230.
- Pulido F, Arribas JR, Delgado R, Cabrero E, Gonzalez-Garcia J, Perez-Elias MJ, et al. Lopinavir-ritonavir monotherapy versus lopinavir-ritonavir and two nucleosides for maintenance therapy of HIV. *AIDS* 2008; **22**:F1–9.
- Meynard JL, Bouteloup V, Landman R, Bonnard P, Baillat V, Cabie A, et al. Lopinavir/ritonavir monotherapy versus current treatment continuation for maintenance therapy of HIV-1 infection: the KALESOLO trial. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**:2436–2444.
- Estebanez M, Arribas JR. Protease inhibitor monotherapy: what is its role? *Curr HIV/AIDS Rep* 2012; **9**:179–185.
- Thompson MA, Aberg JA, Hoy JF, Telenti A, Benson C, Cahn P, et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the International Antiviral Society: USA panel. *J Am Med Assoc* 2012; **308**:387–402.
- Gutmann C, Cusini A, Gunthard HF, Fux C, Hirschel B, Decosterd LA, et al. Randomized controlled study demonstrating failure of LPV/r monotherapy in HIV: the role of compartment and CD4-nadir. *AIDS* 2010; **24**:2347–2354.
- Mathis S, Khanlari B, Pulido F, Schechter M, Negredo E, Nelson M, et al. Effectiveness of protease inhibitor monotherapy versus combination antiretroviral maintenance therapy: a meta-analysis. *PLoS One* 2011; **6**:e22003.
- Valantin MA, Lambert-Niclot S, Flandre P, Morand-Joubert L, Cabie A, Meynard JL, et al. Long-term efficacy of darunavir/ritonavir monotherapy in patients with HIV-1 viral suppression: week 96 results from the MONOI ANRS 136 study. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**:691–695.
- McKinnon JE, Delgado R, Pulido F, Shao W, Arribas JR, Mellors JW. Single genome sequencing of HIV-1 gag and protease resistance mutations at virologic failure during the OK04 trial of simplified versus standard maintenance therapy. *Antivir Ther* 2011; **16**:725–732.
- García F, Vidal C, Plana M, Cruceta A, Gallart MT, Pumarola T, et al. Residual low-level viral replication could explain discrepancies between viral load and CD4+ cell response in human immunodeficiency virus-infected patients receiving antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2000; **30**:392–394.
- Lafeuillade A, Chollet L, Hittinger G, Profizi N, Costes O, Poggi C. Residual human immunodeficiency virus type 1 RNA in lymphoid tissue of patients with sustained plasma RNA of <200 copies/ml. *J Infect Dis* 1998; **177**:235–238.
- Horiike M, Iwami S, Kodama M, Sato A, Watanabe Y, Yasui M, et al. Lymph nodes harbor viral reservoirs that cause rebound of plasma viremia in SIV-infected macaques upon cessation of combined antiretroviral therapy. *Virology* 2012; **423**:107–118.
- Gunthard HF, Havlir DV, Fiscus S, Zhang ZQ, Eron J, Mellors J, et al. Residual human immunodeficiency virus (HIV) type 1 RNA and DNA in lymph nodes and HIV RNA in genital secretions and in cerebrospinal fluid after suppression of viremia for 2 years. *J Infect Dis* 2001; **183**:1318–1327.
- Re MC, Vitone F, Bon I, Schiavone P, Gibellini D. Meaning of DNA detection during the follow-up of HIV-1 infected patients: a brief review. *New Microbiol* 2006; **29**:81–88.
- Chun TW, Murray D, Justement JS, Hallahan CW, Moir S, Kovacs C, et al. Relationship between residual plasma viremia and the size of HIV proviral DNA reservoirs in infected individuals receiving effective antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2011; **204**:135–138.
- Lambert-Niclot S, Flandre P, Valantin MA, Soulie C, Fourati S, Wiriden M, et al. Similar evolution of cellular HIV-1 DNA level in darunavir/ritonavir monotherapy versus triple therapy in MONOI-ANRS136 trial over 96 weeks. *PLoS One* 2012; **7**:e41390.
- Nicastrì E, Palmisano L, Sarmati L, D'Etorre G, Parisi S, Andreotti M, et al. HIV-1 residual viremia and proviral DNA in patients with suppressed plasma viral load (<400 HIV-RNA cp/ml) during different antiretroviral regimens. *Curr HIV Res* 2008; **6**:261–266.
- Rabi SA, Laird GM, Durand CM, Laskey S, Shan L, Bailey JR, et al. Multistep inhibition explains HIV-1 protease inhibitor pharmacodynamics and resistance. *J Clin Invest* 2013; **123**:3848–3860.

DOI:10.1097/QAD.0000000000000312

High prevalence of subtype F in newly diagnosed HIV-1 persons in northwest Spain and evidence for impaired treatment response

Berta Pernas^a, Marta Grandal^a, Alvaro Mena^a, Angeles Castro-Iglesias^a, Angelina Cañizares^b, David L. Wyles^d, Soledad López-Calvo^a, Sonia Pértega^c, Iria Rodríguez-Osorio^a, Jose Domingo Pedreira^a and Eva Poveda^a

HIV-1 non-B subtype variants were found in 37.8% of 296 newly diagnosed persons in northwest Spain over the past 5 years. Subtype F was the most prevalent non-B subtype (29.6%) and displayed preferential transmission among MSM. Virologic response rates to antiretroviral therapy were lower among F subtypes compared to B subtypes at weeks 24 (31% vs. 78.3%), 48 (51.7% vs. 85.2%), and 96 (61.1% vs. 94.3%) of therapy. Subtype F was independently associated with virological response at 24 weeks.

The prevalence of HIV-1 group M non-B subtypes has been increasing in Western Europe in recent years largely as a result of population movements [1]. Specifically, in native Spaniards, the rate of non-B variants increased from 1.5% in 2000–2002 to 11.4% in 2007–2010, with the circulating recombinant form CRF02_AG (37%) being the most common non-B subtype in Spain [2]. Historically, the HIV epidemic in Galicia, a coastal region situated in northwest Spain, has been characterized by a high diversity of HIV genetic forms presumably due to international population movements through this area [3].

Natural polymorphisms at positions associated with resistance are frequently found among reverse transcriptase and protease sequences from HIV non-B variants [4]. Although the impact of these polymorphisms on treatment responses appears limited, recent studies have

demonstrated their relevance in some HIV variants with specific antiretroviral agents [5,6]. Since the prevalence of circulating HIV variants is a dynamic phenomenon and new antiretroviral agents are continually being introduced into the therapeutic arsenal against HIV infection, this issue requires continuous monitoring.

Herein, we describe the characteristics of all newly diagnosed HIV-1 persons in the past 5 years at our institution in northwest Spain serving 501 526 citizens. Patient demographics (age, sex, and risk behavior), and laboratory (HIV-RNA, HIV subtypes, HIV drug resistance and CD4⁺ cell counts) and clinical parameters at the time of diagnosis were recorded. In addition, the response to antiretroviral therapy (ART) was retrospectively analyzed.

A total of 296 newly diagnosed HIV-1 patients were identified from 2009 to 2013 at our institution. HIV subtype could be determined in 230 patients. Non-B variants were found in 37.8% of patients with the following distribution: F (29.6%), C (2.6%), A (2.2%), CRF02_AG (1.7%), G (0.9%), K (0.4%), and CRF01_AE (0.4%). Subsequent analyses were performed comparing the two most prevalent subtypes seen in our population: subtype B ($n = 143$) and subtype F ($n = 68$).

Table 1 displays the main characteristics of this population at the time of diagnosis. Persons infected with subtype F were overwhelmingly male (97.1%) with a predominance of MSM compared to subtype B patients (81.8% vs. 45.8%, respectively; $P < 0.001$). Those infected with subtype F were also significantly younger than those infected with subtype B (36 vs. 39 years, respectively; $P = 0.037$). No differences were found with regard to nationality, with the majority in both groups being Spanish. Likewise, the percentages of subtype F versus B patients with an AIDS-defining illness (24.2% vs. 35%, respectively) or CD4⁺ cell counts below 350 cells/ μ l (42.6% vs. 50.3%, respectively) were similar. The mean CD4⁺ cell count was also comparable between the groups (384.04 vs. 378.03, respectively); however, HIV-RNA levels at the time of diagnosis were higher among subtype F patients compared to subtype B patients (5.3 vs. 4.9 log copies/ml, respectively; $P = 0.002$). The rate of transmitted drug resistance during the study period was 4.2%, and resistance was only found in subtype B sequences.

After diagnosis, 80.8% of subtype F and 72.7% of subtype B patients initiated ART. The rates of virological response after ART initiation were retrospectively evaluated comparing both groups of patients (Table 1). The mean time to initiation of ART was significantly shorter among patients infected with subtype F variants (10.53 vs. 17.60 months, respectively; $P < 0.001$). No differences were observed with regard to the composition of the initial ART regimen between subtype F and B patients: two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) +

one non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) (55.4% vs. 47.5%), two NRTI + one protease inhibitor (35.7% vs. 46.5%) and two NRTI + one integrase inhibitor (INI) (8.9% vs. 6.1%).

Virologic response, defined as achievement of HIV-RNA below 50 copies/ml, was assessed at 24, 48, and 96 weeks after ART initiation. Interestingly, the rates of virologic response were significantly lower among patients infected with subtype F variants compared to subtype B variants at weeks 24 (31% vs. 78.3%), 48 (51.7% vs. 85.2%), and 96 (61.1% vs. 94.3%). Importantly, the virologic response did not vary based on the composition of the ART regimen (e.g. protease inhibitor vs. NNRTI). However, similar mean increases in CD4⁺ cell counts 48 and 96 weeks after ART initiation were seen in both groups (Table 1).

In multivariate analysis, infection with a subtype F variant [odds ratio (OR) 14.8 (2.5–16.7), $P < 0.001$] and a high baseline plasma HIV-RNA level [OR 11.4 (1.7–7.9), $P = 0.001$] were independent predictors of a poor virologic response at 24 weeks after adjusting for ART initiation delay and baseline CD4⁺ cell count.

Subtype F accounts for less than 1% of HIV-1 infections worldwide, primarily being found in Africa (Congo) and South America (Brazil). In Europe, subtype F has an unusually high prevalence in Rumania (>70%) due to parenteral transmission in children during the late 1980s [7]. Recently, subtype F HIV-1 infection has also been recognized among Italian heterosexual men [8]. A rapid expansion of HIV-1 subtype F among MSM in Galicia was reported in newly diagnosed patients during 2010–2011 [9]. Herein we confirm the continued spread of subtype F among MSM in northwest Spain and, for the first time, provide evidence of a suboptimal response to ART when compared with subtype B patients.

In regard to treatment response, some studies have highlighted the relevance of natural polymorphisms conferring resistance to specific antiretrovirals among ART-naïve individuals infected with non-B subtypes [5,6]. In this study, no significant differences were observed in the prevalence of major polymorphisms associated with resistance to antiretrovirals within reverse transcriptase or protease sequences from subtype F and B viruses. As expected, some differences in minor polymorphisms were found. The variant V106I, which is associated with low-level resistance to the NNRTI etravirine [10,11], was found more frequently among subtype F (compared to subtype B) sequences (83.8% vs. 3.5%, respectively; $P < 0.001$). Similarly, variants L10V, M36I, and L89M at positions associated with resistance to protease inhibitors were more frequent among subtype F (compared to subtype B) sequences (91.2% vs. 6.3%; 89.1% vs. 32.2%; and 91.2% and 8.4%, respectively; $P < 0.001$). The presence of these polymorphisms has been associated with a reduced susceptibility to the

Table 1. Characteristics of newly HIV diagnosed patients at the time of diagnosis and response to antiretroviral therapy (subtypes B versus F).

Characteristics	N=211		P
	Subtype F (n=68)	Subtype B (n=143)	
Male (%)	97.1	86	0.014
Age	36.23 ± 9.9	39.28 ± 9.7	0.037
Routes of HIV transmission (%)			<0.001
Heterosexual	16.7	47.3	
Homosexual	81.8	45.8	
Others (including IDU)	1.5	6.9	
Spanish (%)	76.5	83.2	0.263
AIDS-defining diseases (%)	24.2	35	0.121
Late diagnosis (%)	42.6	50.3	0.295
Mean CD4 ⁺ at diagnosis time	384.04 ± 231.201	378.03 ± 316.800	0.512
Mean HIV-RNA (log copies/ml) at diagnosis time	5.3 ± 0.85	4.96 ± 0.81	0.002
Transmitted drug resistance (%)	0	4.2	0.180
Response to ART	n=55	n=104	
ART initiation delay after diagnosis (months)	10.53 ± 16.729	17.60 ± 22.485	<0.001
Regimens at ART initiation (%)			0.401
2 NRTI + 1 NNRTI	55.4	47.5	
2 NRTI + PI	35.7	46.5	
2 NRTI + INI	8.9	6.1	
Patients with HIV-RNA <50 copies/ml after ART initiation			
At 24 weeks on therapy (%)	31	78.3	<0.001
At 48 weeks on therapy (%)	51.7	85.2	<0.001
At 96 weeks on therapy (%)	61.1	94.3	0.005
Mean CD4 ⁺ cells/ μ l increase after 48 weeks after ART	271.34 ± 186.333	260.71 ± 190.891	0.788
Mean CD4 ⁺ cells/ μ l increase after 96 weeks after ART	256.35 ± 190.545	315.58 ± 275.593	0.432

ART, antiretroviral therapy; IDU, injecting drug user; INI, integrase inhibitor; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor; PI, protease inhibitor.

protease inhibitor tipranavir in subtype F specimens (fold-changes <2.7); however, no impact on darunavir susceptibility was found [5]. Since none of the patients in this study were treated with etravirine or tipranavir-based regimens, the presence of polymorphisms associated with reduced susceptibility to these drugs does not account for the poor virologic response observed among subtype F patients. Therefore, the susceptibility of subtype F variants to antiretroviral agents currently used for the treatment of HIV infection needs to be assessed.

Of note, in the study published by Poveda *et al.* [5], subtype F possessed the highest replication capacity (performed by Phenosense assay; Monogram Biosciences, San Francisco, California, USA) among the HIV subtypes tested. This finding is consistent with the significantly higher baseline plasma HIV-RNA levels observed among subtype F patients in our population. However, in the multivariate analysis accounting for baseline viral load, subtype F infection retained a significant association with delayed virologic response.

Poor adherence to ART in the group of subtype F patients is another possible explanation for the lower rates of virologic response. Although a direct measurement of adherence is not available in this study, several studies have reported a higher degree of adherence to ART and HIV care among the MSM population than in other HIV-risk groups [12]. Moreover, similar increases in CD4⁺ cell counts were seen after ART initiation in both groups; therefore, poor adherence among subtype F patients is an

unlikely explanation for the poor virologic outcomes. Finally, there was no difference between the groups in terms of the number of different ART regimens initiated during the study period.

In summary, subtype F is the most prevalent non-B subtype among newly diagnosed HIV-1-infected persons in northwest Spain, with preferential transmission among MSM. For the first time, we have identified a significantly slower virologic response to ART among subtype F patients. Subtype F and a high baseline HIV-RNA were the major determinants of a poor virologic response to ART. Factors not associated with virologic response include: the timing of ART initiation, baseline CD4⁺ cell count, and the initial ART regimen (NNRTI vs. protease inhibitor). Given the potential clinical implications of these results, additional studies are warranted to identify the reasons for poor ART virologic response in subtype F patients.

Acknowledgements

Funding: The work was supported in part by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (CP08/00214, PI10/02166, PI13/02266), and Fundación Profesor Novoa Santos, A. Coruña.

Author contributions: E.P. did the study design. B.P., M.G., A.M., A.C.-I., A.C., S.L.-C., I.R.-O., J.D.-P., and

E.P. contributed with laboratory and clinical data. E.P. and S.P. did the statistical analysis. E.P., B.P., and D.W. wrote the manuscript. All authors revised and provided critical comments.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

^aGrupo de Virología Clínica, ^bServicio de Microbiología, ^cUnidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística, INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, A Coruña, Spain, and ^dDivision of Infectious Diseases, University of California, San Diego, La Jolla, California, USA.

Correspondence to Dr Eva Poveda, Grupo de Virología Clínica, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), As Xubias s/n, A Coruña 15006, Spain.

Tel: +34 981 17 63 99; fax: +34 981 17 63 98; e-mail: eva.poveda.lopez@sergas.es

Received: 18 March 2014; revised: 29 April 2014; accepted: 30 April 2014.

References

- Abecasis AB, Wensing AM, Paraskevis D, Vercauteren J, Theys K, Van de Vijver DA, et al. HIV-1 subtype distribution and its demographic determinants in newly diagnosed patients in Europe suggest highly compartmentalized epidemics. *Retrovirology* 2013; **10**:7.
- Treviño A, Soriano V, Rodríguez C, Arredondo M, Rivas P, Herrero-Mendoza D, et al. Changing rate of non-B subtypes and coinfection with hepatitis B/C viruses in newly diagnosed HIV type 1 individuals in Spain. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011; **27**:633–638.
- Thomson MM, Delgado E, Manjón N, Ocampo A, Villahermosa ML, Mariño A, et al. HIV-1 genetic diversity in Galicia Spain: BG intersubtype recombinant viruses circulating among injecting drug users. *AIDS* 2001; **15**:509–516.
- Kantor R, Katzenstein D, Efron B, Carvalho AP, Wynhoven B, Cane P, et al. Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *PLoS Med* 2005; **2**:e112.
- Poveda E, de Mendoza C, Parkin N, Choe S, García-Gasco P, Corral A, Soriano V. Evidence for different susceptibility to tipranavir and darunavir in patients infected with distinct HIV-1 subtypes. *AIDS* 2008; **22**:611–616.
- Garrido C, Soriano V, Geretti AM, Zahonero N, Garcia S, Booth C, et al. Resistance associated mutations to dolutegravir (S/GSK1349572) in HIV-infected patients-impact of HIV subtypes and prior raltegravir experience. *Antiviral Res* 2011; **90**:164–167.
- Apetrei C, Necula A, Holm-Hansen C, Lousert-Ajaka I, Pandea I, Cozmei C, et al. HIV diversity in Romania. *AIDS* 1998; **12**:1079–1085.
- Lai A, Simonetti F, Zehender G, De Luca A, Micheli V, Meraviglia P, et al. HIV-1 subtype F1 epidemiological networks among Italian heterosexual males are associated with introduction events from South America. *PLoS One* 2012; **7**:e42223.
- Thomson MM, Fernández-García A, Delgado E, Vega Y, Díez-Fuertes F, Sánchez-Martínez M, et al. Rapid expansion of HIV-1 subtype F cluster of recent origin among men who have sex with men in Galicia. *Spain J Acquir Immune Defic Syndr* 2012; **59**:e49–e51.
- Poveda E, de Mendoza C, Pattery T, González MM, Villacian J, Soriano V. Phenotypic impact of resistance mutations on etravirine susceptibility in HIV patients with prior failure to non-nucleoside analogues. *AIDS* 2008; **22**:2393–2400.
- Vingerhoets J, Nijs S, Tambuyzer L, Hoogstoel A, Anderson D, Pichio G. Similar predictions of etravirine sensitivity regardless of genotypic testing method used: comparison of available scoring systems. *Antivir Ther* 2012; **17**:1571–1579.
- Giordano TP, Hartman C, Gilford AL, Backus LI, Morgan KO. Predictors of retention in HIV care among a national cohort of US veterans. *HIV Clin Trials* 2009; **10**:299–305.

DOI:10.1097/QAD.0000000000000326

HIV-1 superinfection with a triple-class drug-resistant strain in a patient successfully controlled with antiretroviral treatment

Erika Castro^{a,c}, Hong Zhao^b, Matthias Cavassini^a, James I. Mullins^b, Giuseppe Pantaleo^c and Pierre-Alexandre Bart^{c,d}

We report a case of HIV-1 superinfection (HSI) with a clade B, triple-class resistant virus in a patient successfully controlling viremia with continuous combination antiretroviral therapy started 8 years earlier during primary HIV infection. The course of HIV infection prior to HSI was monitored in both the source partner and recipient (8 and 11 years, respectively) and 4 years following HSI. This case report demonstrates re-infection with HIV-1 despite effective combination antiretroviral therapy.

HIV-1 superinfection (HSI), that is, infection with a second strain after the first has been established, has been reported since 2002, mainly involving HIV group M clades [1–6], and in a smaller proportion as inter-group recombinant forms [7,8]. Overall, HSI has been most often observed in untreated patients, during treatment interruption, and in seroconcordant couples with poor viral suppression [9]. Here, we report the onset and 4-year follow-up of HSI with a triple-class resistant clade B virus in a man on effective combination antiretroviral therapy (cART).

Briefly, blood samples were obtained from two men (M1 and M2) chronically infected with HIV-1 and sexual partners since 2006. M2 was diagnosed with HIV infection in 1994 at stage A2 with full Western blot seroconversion, and developed triple-class antiretroviral drug resistance as a consequence of weak adherence to ART, leading to virologic failure. M2 experienced uncontrolled viremia (range 3–4 logs of viral RNA) until September 2008 when a salvage treatment regimen reduced his viral load to undetectable limit for the first time (Fig. 1a). M1 was diagnosed in 2000 with primary HIV infection, initiated cART in 2000, and remained on cART with undetectable viremia and no drug resistance mutations through the end of 2007 (Fig. 1b). cART first

ESTUDIO 3:

**Impacto de los Blips y los Episodios de Baja Viremia en Pacientes
VIH+ con Supresión Viroológica con Tratamiento Antirretroviral.**

Resumen:

El objetivo del TAR es alcanzar y mantener la supresión virológica (ARN-VIH < 50 copias/mL) en el tiempo. Sin embargo, se ha descrito en pacientes con TAR supresor, la presencia de episodios intermitentes de viremia detectable de bajo nivel. Aunque el significado clínico de estos episodios es incierto, se ha descrito que ocasionalmente podrían anticipar el fracaso virológico (FV) o la selección de mutaciones de resistencia.

El objetivo de este estudio fue evaluar retrospectivamente la presencia de episodios de baja viremia plasmática en los nuevos diagnósticos de infección por VIH que alcanzaron la supresión virológica con TAR, así como la presencia de FV durante el seguimiento hasta el 1 de enero de 2015. La carga viral plasmática fue evaluada utilizando el test Roche COBAS Taqman versión 2.0 con un límite de cuantificación de 20 copias/mL. Los resultados de carga viral se informaron como detectable y cuantificable (ARN-VIH > 20 copias/mL), no detectable (ND), y detectable pero no cuantificable (DNC) por debajo de 20 copias/mL.

Para el análisis, los pacientes se asignaron a los siguientes grupos: a) pacientes con viremia siempre ND; b) pacientes con determinaciones aisladas de viremia DNC (ARN-VIH < 20 copias/mL); c) pacientes con ≥ 3 determinaciones consecutivas de viremia DNC; d) pacientes con episodios aislados de viremia de bajo nivel (20-50 copias/mL) precedido y seguido de viremia ND o DNC; y e) pacientes con blips, definido según las guías del Grupo Español de Estudio de SIDA "GeSIDA" como una determinación de ARN-VIH entre 50-200 copias/mL precedido y seguido por una determinación por debajo de 50 copias/mL. Se definió FV como la presencia de ARN-VIH > 50 copias/mL en dos visitas consecutivas.

En el periodo de seguimiento, de los 565 nuevos diagnósticos de infección por VIH, el 80.2% de los pacientes iniciaron TAR, y de estos, el 78.2% alcanzaron la supresión virológica. Solo aquellos pacientes con un mínimo de tres meses de seguimiento y al menos dos determinaciones de carga viral plasmática tras alcanzar la supresión virológica con TAR fueron analizados, incluyendo finalmente en el análisis a 326 pacientes. El 22.7% de los pacientes presentaron blips y un 8.3% experimentaron FV, con una media de seguimiento de 42 ± 29 meses.

El riesgo de FV a los 12, 24 y 60 meses fue de 8.6%, 16.5% y 27.5% para los pacientes con blips frente a un 4.3% para los pacientes con viremia plasmática siempre ND; los pacientes con ≥ 3 determinaciones consecutivas de viremia DNC tuvieron un riesgo de FV de 6.2% a los 12 meses, y del 33.7% a los 24 y 60 meses ($p < 0.001$). El análisis multivariante identificó estas diferencias en los niveles de ARN-VIH en plasma por debajo de los límites de detección/cuantificación como predictor independiente de FV ($p=0.008$). El riesgo de FV fue mayor para los pacientes con blips (HR 2.500 [IC 95% 0.524-11.926]) y con ≥ 3 determinaciones consecutivas de viremia DNC (HR 3.813 [IC 95% 0.675-21.926]). Los pacientes con ≥ 3 determinaciones consecutivas DNC presentaron además un mayor riesgo de fracaso virológico con ARN-VIH confirmado > 200 copias/mL (HR 6.943 [IC 95% 0.728-66.261], $p=0.092$).

Los resultados obtenidos de este estudio han sido publicados en “Journal of Antimicrobial Chemotherapy” en Abril de 2016. Online ISSN: 1460-2091, Factor de Impacto JCR: 5.313

Any impact of blips and low-level viraemia episodes among HIV-infected patients with sustained virological suppression on ART?

Berta Pernas¹, Marta Grandal¹, Sonia Pertega², Angelina Cañizares³, Ángeles Castro-Iglesias¹, Álvaro Mena¹, Iria Rodríguez-Osorio¹, Andrés Tabernilla¹, José D. Pedreira³ and Eva Poveda^{1*}

¹Grupo de Virología Clínica, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC)-Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), SERGAS, Universidad de A Coruña, A Coruña, Spain; ²Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC)-Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), SERGAS, Universidad de A Coruña, A Coruña, Spain; ³Servicio de Microbiología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC)-Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), SERGAS, Universidad de A Coruña, A Coruña, Spain

*Corresponding author. Tel: +34-981-17-63-99; Fax: +34-981-17-63-98; E-mail: eva.poveda.lopez@sergas.es

Received 14 August 2015; returned 10 October 2015; revised 11 November 2015; accepted 14 November 2015

Objectives: The objective of this study was to evaluate the prevalence of blips and risk of virological failure (VF) among HIV-infected patients with sustained virological suppression (HIV-RNA <50 copies/mL) on ART.

Methods: Newly diagnosed (2004–13) HIV-infected patients with sustained virological suppression on ART (minimum follow-up of 3 months) were identified. Risk of VF was evaluated according to different plasma HIV-RNA quantification values based on the limits of quantification/detection of current commercial assays (20 copies/mL). Kaplan–Meier and Cox proportional hazards models were used to compare the cumulative incidence of VF.

Results: A total of 565 newly diagnosed HIV-infected patients were identified: 453 started ART and 354 achieved virological suppression. Prevalence of blips (isolated HIV-RNA ranging from 50 to 200 copies/mL) and VF (HIV-RNA \geq 50 copies/mL) was 22.7% and 8.8%, respectively (mean follow-up of 42 months). Multivariate analysis identified differences between HIV-RNA values as an independent predictor of VF ($P=0.008$); risk of VF was higher for patients with blips [HR 2.500 (95% CI 0.524–11.926)] and for those with at least three consecutive detected, but not quantified, HIV-RNA determinations (HIV-RNA <20 copies/mL) [HR 3.813 (95% CI 0.675–21.535)]. Moreover, only HIV-infected patients with at least three consecutive detected, but not quantified, HIV-RNA determinations showed a higher probability of virological rebound with >200 copies/mL [33.7% at 24 and 60 months versus <5% for other HIV-RNA values; HR 6.943 (0.728–66.261), $P=0.092$].

Conclusions: Blips are frequent (22.7%) among HIV-infected patients with sustained virological suppression on ART. HIV patients with blips and at least three consecutive detected, but not quantified, HIV-RNA determinations (<20 copies/mL) had a higher risk of VF. These findings highlight the relevance of maintaining HIV-RNA levels below the limits of quantification of current assays (<20 copies/mL).

Introduction

The current goal of ART is HIV-RNA suppression <50 copies/mL. However, intermittent episodes of detectable low-level viraemia (50–1000 copies/mL) have been described among HIV patients who achieved virological suppression.^{1,2} Blips do not always lead to negative clinical outcomes, although they may occasionally anticipate virological failure (VF) and the selection of drug-resistant HIV variants.^{1–4} Moreover, there is evidence for residual low-level viraemia <50 copies/mL in patients on stable suppressive ART.^{5–7}

Several studies have suggested a potential role of blips and low-level viraemia events in the likelihood of VF. However, their clinical relevance is not yet clearly established because of the controversial

results obtained, probably due to heterogeneity among the different studies (i.e. baseline patient characteristics and definitions of blips and VF).

In this context, the aim of the study was to evaluate the incidence of blips and low-level viraemia in a cohort of newly diagnosed HIV-infected patients on suppressive ART and to identify those factors associated with VF.

Methods

All HIV-infected patients newly diagnosed from 1 January 2004 to 31 December 2013 in a reference hospital in north-west Spain were recorded. Those who started ART and reached HIV-RNA levels <50 copies/mL were identified and followed until 1 January 2015. Epidemiological, clinical and

immunovirological characteristics at diagnosis were recorded. The research protocol was approved by the regional ethics committee ('Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia', register code 2013/247).

Plasma viral load was determined using the Roche COBAS TaqMan test version 2.0 (limit of quantification = 20 copies/mL). HIV-RNA quantification was interpreted as follows: detectable (HIV-RNA >20 copies/mL); not detectable (ND); and detectable, but not quantified (<20 copies/mL) (DNQ).

For subsequent analysis, HIV-infected patients with virological suppression under ART were assigned to the following groups: (i) all determinations ND; (ii) one to two determinations DNQ; (iii) at least three consecutive episodes of DNQ determinations; (iv) intermittent low-level viraemia (ILLV) episodes, i.e. HIV-RNA values of 20–50 copies/mL preceded and followed by ND or DNQ viraemia; and (v) blips, i.e. HIV-RNA value of 50–200 copies/mL preceded and followed by another value <50 copies/mL, according to the definition of the Spanish AIDS Study Group (GeSIDA) guidelines.⁸

VF was defined as HIV-RNA \geq 50 copies/mL at two consecutive visits according to GeSIDA and European AIDS Clinical Society guidelines.^{8,9} Finally, virological rebound was defined as confirmed HIV-RNA \geq 200 copies/mL (VR200) according to the US Department of Health and Human Services guidelines.¹⁰ Adherence was indirectly evaluated by determining the rate of lost pharmaceutical consultation, a delay of \geq 15 days after programmed consultation, which might have increased the risk of having no ART medication.

Statistical analysis was performed using Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS 19.0, Chicago, IL, USA). Categorical variables were presented as the number of cases or percentage and compared by the χ^2 test or Fisher's exact test when appropriate. Continuous variables were expressed as the mean \pm SD and compared by the non-parametric Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test when appropriate. Kaplan-Meier curves were used to evaluate the probability of both VF and VR200 during follow-up and differences between groups were assessed by the log-rank test and Cox regression analysis, calculating the HR and 95% CI. A *P* value <0.05 was considered statistically significant.

Results

A total of 565 newly diagnosed HIV-infected patients were identified during the study period. Overall, 453 (80.2%) patients started ART and 354 (78.1%) of them achieved suppressed viraemia (HIV-RNA <50 copies/mL). Only patients with a minimum period of follow-up of 3 months, with at least two viral load determinations available after achieving suppressed viraemia, were examined. A total of 326 patients were considered for analysis with a mean time of follow-up of 42 ± 29 months. The rate of blips and ILLV was 22.7% and 24.8%, respectively. Epidemiological, clinical and immunovirological characteristics are shown in Table 1.

After achieving HIV-RNA suppression, 8.8% (*n* = 27) of patients experienced VF and 3.6% (*n* = 12) experienced VR200. Time to VF and VR200 according to the presence of blips, ILLV, DNQ viraemia or ND viraemia are shown in Figure 1, with differences between groups (*P* < 0.001 for VF and *P* = 0.004 for VR200).

Viral load values >100 000 copies/mL at diagnosis (*P* = 0.013) and adherence to treatment (proportion of lost pharmaceutical consultation \geq 5%) (*P* = 0.044) were predictors of VF in the Kaplan-Meier univariate analysis. Conversely, none of the following variables was associated with VF: route of transmission (*P* = 0.445); AIDS-defining criteria at diagnosis (*P* = 0.539); CD4+ count <200 cells/mm³ at diagnosis (*P* = 0.491); HIV-1 genetic subtype (*P* = 0.703);¹¹ presence of transmitted drug resistance mutations (*P* = 0.487);¹² and ART regimen (NNRTI- versus PI-based treatment) (*P* = 0.756).

Multivariate analysis, adjusted by CD4+ <200 cells/mm³, HIV-RNA >100 000 copies/mL and AIDS-defining disease at diagnosis, identified adherence [HR 2.409 (95% CI 1.073–5.411), *P* = 0.033] and different values of HIV-RNA quantification and/or detection (*P* = 0.008) as predictors of VF. Patients with blips [HR 2.500 (95% CI 0.524–11.926), *P* = 0.250] and at least three consecutive DNQ HIV-RNA determinations [HR 3.813 (95% CI 0.675–21.535), *P* = 0.130] were more likely to have VF. Similarly, multivariate analysis for VR200 shows that different viraemic groups (*P* = 0.008) and adherence [HR 4.146 (95% CI 1.095–15.696), *P* = 0.036] were independent predictors of VR200, after adjusting by the same variables. The presence of at least three consecutive DNQ HIV-RNA determinations shows a higher probability of VR200 compared with those patients with ND determinations [HR 6.943 (95% CI 0.728–66.261), *P* = 0.092].

Discussion

The clinical consequences for patients experiencing blips or low-level viraemia remain unclear. This study suggests that HIV-infected patients who achieved viral load suppression under ART, but have at least three consecutive DNQ viral load determinations below the limit of quantification (<20 copies/mL) or have blips, are more likely to have VF. Indeed, only those patients with at least three consecutive DNQ HIV-RNA determinations have shown a higher risk of VR200.

Virological suppression had been historically defined considering the limits of detection of the commercial assays available, which have been improving from 400 copies/mL for first-generation assays, then 50 copies/mL and, currently, 20 copies/mL.^{13,14} According to current HIV guidelines, the goal of ART is to maintain virological suppression <50 copies/mL.^{8,9} However, in patients on stable suppressive ART, persistent or transient residual viraemia below the cut-off of 50 copies/mL is observed.^{5,6} The source of this residual viraemia remains controversial and could be explained by virus release from activation of latently infected CD4+ T cells or viral replication as a consequence of suboptimal therapy with the consequent risk of selection of resistance.^{5,15}

The clinical relevance of low-level viraemia <50 copies/mL or even of HIV-RNA detection below the limit of quantification (<20 copies/mL) of current commercial assays remains uncertain.¹⁶ This scenario makes it necessary to determine the frequency of these events and their impact in the clinical success of ART in HIV-infected patients.

In this study, the prevalence of blips was 22.7%, similar to other studies, which have shown a prevalence ranging from 20% to 40%.^{2–4} Many studies agree that occasional blips are common and do not reflect viral replication nor predict VF,^{4,17} but others have found an association between their presence and subsequent VF.^{1,16,18,19} Likewise, this study shows an association between the presence of blips and VF (8.6%, 16.5% and 27.5% at 12, 24 and 60 months, respectively). Of note, HIV patients with at least three consecutive DNQ HIV-RNA determinations were more likely to have VF (Figure 1). Interestingly, only the presence of at least three consecutive DNQ viral load determinations was associated with a higher risk of VR200 with rates of 33.7% at 24 and 60 months compared with rates of <5% for other viraemic groups. Multivariate analysis (adjusted by CD4+ <200 cells/mm³, HIV-RNA >100 000 copies/mL and AIDS-defining disease at

Table 1. Baseline characteristics of the study population

	Blips (n=74)	ILLV (n=81)	≥3 consecutive DNQ (n=27)	DNQ viraemia (n=95)	ND viraemia (n=49)	P ^a
Male, %	82.4	79	88.9	81.1	75.5	0.680
Age (years), mean ± SD	38.7 ± 9.3	37.3 ± 12	42.8 ± 12.3	37.6 ± 9.2	37.5 ± 10.6	0.190
Route of transmission, %						
MSM	35.6	27.6	33.3	36.3	35.6	
heterosexual	52.1	50	66.7	41.8	55.6	
IVDU	12.3	22.5	0	22	8.9	
AIDS at diagnosis, %	50	46.9	30.8	33.7	20.4	0.005
CD4+ <200 cells/mm ³ at diagnosis, %	43.2	43.2	30.8	28	18.4	0.012
Viral load >100000 copies/mL at diagnosis	73.6	63.8	61.5	33.3	26.5	<0.001
Positive for hepatitis B virus surface antigen, %	5.5	2.5	0	2.1	6.1	
Positive for hepatitis C virus antibody, %	15.1	23.8	11.5	23.9	16.7	0.377
HIV-1 subtype, %						
B	67.9	62.5	72.2	66	69.2	
F	25	28.1	22.2	22.6	17.9	
other subtype	7.1	9.4	5.6	11.3	12.8	
ART regimen (%)						0.542 ^b
two NRTIs + NNRTI	42.5	47.5	51.9	50	58.3	
two NRTIs + PI	52.1	45	44.4	41.5	37.5	
two NRTIs + integrase inhibitor	4.1	3.8	3.7	5.3	2.1	
other regimen	1.4	3.8	0	3.2	2.1	
Time to suppressed viraemia (HIV-RNA <50 copies/mL) (weeks), mean ± SD	40.4 ± 27.1	43.5 ± 44.9	41.6 ± 44.1	31.1 ± 35.3	29. ± 21.6	0.006
Lost pharmaceutical consultation (≥15 days) ^c , mean ± SD	5.4 ± 4.8	7.9 ± 8.9	4.5 ± 5.5	6.4 ± 7.8	4.7 ± 7.3	0.017

Blips, HIV-RNA value ranging from 50 to 200 copies/mL preceded and followed by another value <50 copies/mL; ILLV, intermittent low-level viraemia episodes, i.e. HIV-RNA value ranging from 20 to 50 copies/mL preceded and followed by another value <20 copies/mL; ≥3 consecutive DNQ viraemia, three or more consecutive detected, but not quantified, HIV-RNA determinations <20 copies/mL; DNQ viraemia, patients with one or two detected, but not quantified, HIV-RNA determinations <20 copies/mL; ND viraemia, all HIV-RNA determinations were not detected.

^aUnivariate analysis.

^bComparing NNRTI versus PI regimen.

^cLost pharmaceutical consultation (>15 days) means the percentage of lost pharmaceutical consultation with a delay of ≥15 days after programmed consultation and, therefore, with potential, but not mandatory, risk of having no ART medication.

diagnosis) identified the presence of at least three consecutive DNQ viral load determinations and treatment adherence as independent predictors of both VF and VR200. Doyle and Geretti,⁵ Doyle et al.⁶ and Calcagno et al.⁷ have also recognized that among HIV-infected patients under ART, HIV-RNA values between 40 and 49 copies/mL and, to a lesser extent, <40 copies/mL predict VF considering two definitions, >50 and >400 copies/mL, independently of other recognized determinants (i.e. adherence and ART regimen).

Altogether, these findings suggest that a prolonged and continuous presence of residual viral replication might favour a subsequent VF more than isolated blips of viraemia, which could be the result of different factors (i.e. adherence and intra-assay variability among determinations). This scenario would increase the potential risk of developing resistance mutations and, consequently, treatment failure.²⁰ Therefore, clinical monitoring of these patients, focused on adherence, evaluation of potential drug–drug interactions with concomitant medications, appropriate food intake when indicated and

detailed evaluation of the presence of drug resistance mutations, is recommended.

The present study has some limitations. There is a low number of VF that might explain the lack of statistical significance for the association between VF and the presence of blips or at least three consecutive DNQ HIV-RNA determinations compared to the group of ND viraemia. However, the association becomes significant when we analyse different viraemic groups together. Second, the impact of VF on the risk of developing drug resistance mutations has not been evaluated, as most cases of VF had HIV-RNA <200 copies/mL.

In conclusion, this study provides new data for a better understanding of the clinical impact of low-level viraemia events among HIV-infected patients under stable suppressive ART. The main finding was the identification of the presence of at least three consecutive DNQ HIV-RNA determinations below the limit of quantification of current commercial assays (<20 copies/mL) as being associated with a higher risk of VF. Therefore, the goal of ART should be revised to a lower cut-off of 50 copies/mL considering

Pernas et al.

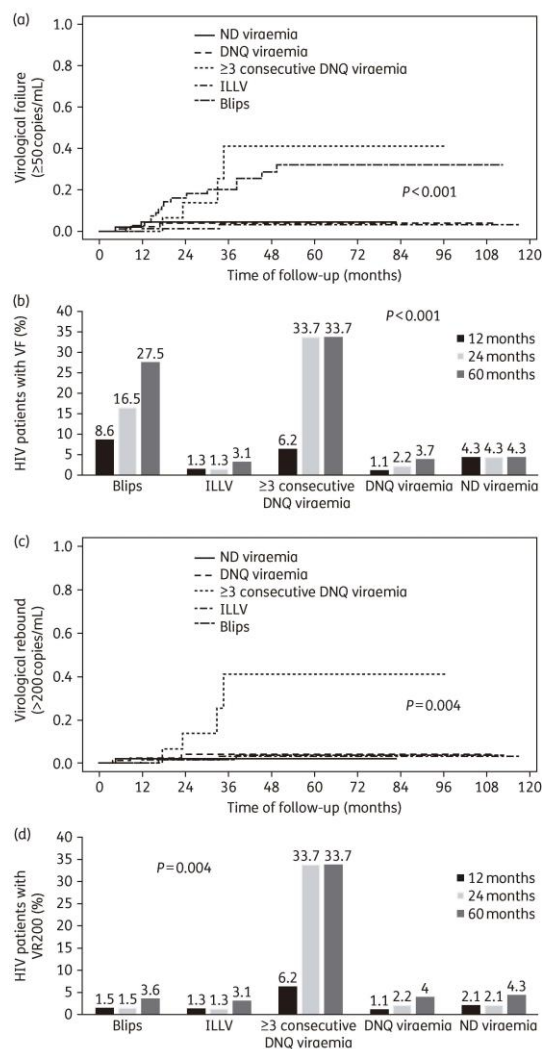


Figure 1. Rates of VF (confirmed HIV-RNA ≥ 50 copies/mL) after achieving HIV-RNA < 50 copies/mL according to the following viraemic groups: ND viraemia, all HIV-RNA determinations were not detected; DNQ viraemia, patients with one or two detected, but not quantified, HIV-RNA determinations < 20 copies/mL; ≥ 3 consecutive DNQ viraemia, three or more consecutive detected, but not quantified, HIV-RNA determinations < 20 copies/mL; ILLV, intermittent low-level viraemia episodes, i.e. HIV-RNA value ranging from 20 to 50 copies/mL preceded and followed by another value < 20 copies/mL; and blips, HIV-RNA value ranging from 50 to 200 copies/mL preceded and followed by another value < 50 copies/mL. (a) Time to VF according to Kaplan–Meier analysis. (b) Proportion of HIV patients on ART with VF at 12, 24 and 60 months after achieving virological suppression. (c) Time to VR200 according to Kaplan–Meier analysis. (d) Proportion of HIV patients on ART with VR200 at 12, 24 and 60 months after achieving virological suppression.

Downloaded from <http://jac.oxfordjournals.org/> by guest on April 4, 2016

the limit of detection/quantification of current available assays. Meanwhile, close clinical monitoring would be advisable for these patients with special emphasis on treatment adherence.

Acknowledgements

We acknowledge Fina Baliñas (HIV and Viral Hepatitis Unit, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña) and Biobanco A Coruña (SERGAS) for providing us with the technical, ethical and legal advice necessary for the development of our research.

Funding

This work was supported in part by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (CPII14/00014, P110/02166, P113/02266) and Fundación Profesor Novoa Santos, A Coruña.

Transparency declarations

None to declare.

References

- García-Gascó P, Maida I, Blanco F *et al.* Episodes of low-level viral rebound in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: frequency, predictors and outcome. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 699–704.
- Greub G, Cozzi-Lepri A, Ledergerber B *et al.* Intermittent and sustained low-level HIV viral rebound in patients receiving potent antiretroviral therapy. *AIDS* 2002; **16**: 1967–9.
- Castro P, Plana M, González R *et al.* Influence of episodes of intermittent viremia ('blips') on immune responses and viral load rebound in successfully treated HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2013; **29**: 68–76.
- Grennan JT, Loutfy MR, Su D *et al.* Magnitude of virologic blips is associated with a higher risk for virologic rebound in HIV-infected individuals: a recurrent events analysis. *J Infect Dis* 2012; **205**: 1230–8.
- Doyle T, Geretti AM. Low-level viremia on HAART: significance and management. *Curr Opin Infect Dis* 2012; **25**: 17–25.
- Doyle T, Smith C, Vitiello P *et al.* Plasma HIV-1 RNA detection below 50 copies/ml and risk of virologic rebound in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2012; **54**: 724–32.
- Calcagno A, Motta I, Ghisetti V *et al.* HIV-1 very low level viremia is associated with virological failure in highly active antiretroviral treatment-treated patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2015; **31**: 999–1008.
- Panel de expertos de GeSIDA y Plan Nacional sobre el Sida. Documento de consenso de GeSIDA/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (Actualización enero 2015). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2015; **33**: 544–56.
- European AIDS Clinical Society. *Guidelines, Version 8.0, October 2015*. http://www.eacsociety.org/files/guidelines_8_0-english_web.pdf.
- Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. *Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents*. Department of Health and Human Services. <https://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/vguidelines/adultandadolescentgl.pdf>.
- Pernas B, Mena A, Cañizares A *et al.* Trends on epidemiological, virological and clinical features among newly diagnosed HIV-1 persons in Northwest Spain over the last 10 years. *J Med Virol* 2015; **87**: 1319–26.
- De Mendoza C, Anta L, García F *et al.* HIV-1 genotypic drug resistance interpretation rules—2009 Spanish guidelines. *AIDS Rev* 2009; **11**: 39–51.
- Schuurman R, Deschamps D, Weverling GJ *et al.* Multicenter comparison of three commercial methods for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 1996; **34**: 3016–22.
- Ruelle J, Debaisieux L, Vancutsem E *et al.* HIV-1 low-level viraemia assessed with 3 commercial real-time PCR assays show high variability. *BMC Infect Dis* 2012; **12**: 100.
- Sigal A, Kim JT, Balazs AB *et al.* Cell-to-cell spread of HIV permits ongoing replication despite antiretroviral therapy. *Nature* 2011; **477**: 95–8.
- Laprise C, Pokomandy A, Baril JG *et al.* Virologic failure following persistent low-level viremia in a cohort of HIV-positive patients: results from 12 years of observation. *Clin Infect Dis* 2013; **57**: 1489–96.
- Raboud JM, Rae S, Woods *et al.* Consecutive rebounds in plasma viral load are associated with virological failure at 52 weeks among HIV-infected patients. *AIDS* 2002; **16**: 1627–32.
- Hofstra LM, Mudrikova T, Stam AJ *et al.* Residual viremia is preceding viral blips and persistent low-level viremia in treated HIV-1 patients. *PLoS One* 2014; **9**: e110749.
- Ryscaravage P, Kelly S, Li JZ *et al.* Significance and clinical management of persistent low-level viremia and very-low-level viremia in HIV-1-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 3585–98.
- Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration (ART-CO), Vandenhende MA, Ingle S *et al.* Impact of low-level viremia on clinical and virological outcomes in treated HIV-1-infected patients. *AIDS* 2015; **29**: 373–83.

DISCUSIÓN

7.1 Discusión Estudio I: Características Epidemiológicas, Viroológicas y Clínicas de los Nuevos Diagnósticos de Infección por VIH en el Noroeste de España en el periodo 2004-2013.

Este estudio evalúa las características de la cohorte de nuevos diagnósticos de infección por VIH en nuestra área sanitaria en el periodo 2004-2013. Se observó un incremento significativo en el número de nuevos diagnósticos de VIH desde 47 casos/año en el periodo 2004-2008 hasta 66 casos/año en el periodo 2009-2013. La epidemia por VIH afecta principalmente a varones (83%) jóvenes, con una edad media de 37 años, siendo la transmisión sexual la principal vía de infección (82%). Este incremento en el número de nuevas infecciones por VIH podría estar justificado por un incremento en la incidencia de VIH, por modificaciones en los patrones de cribado de VIH o por ambos motivos, y podría estar en relación con la alta prevalencia de HSH observada en nuestra población desde el año 2009. De hecho, aunque a nivel mundial se ha observado un descenso aproximado del 30% en el número de nuevas infecciones por VIH, se ha descrito un incremento de la prevalencia de VIH entre HSH en Europa y Norteamérica [Van Griensven *et al.* 2009; WHO/UNAIDS 2015]. El gran impacto que el TAR ha tenido al disminuir la morbimortalidad asociada al VIH podría justificar parcialmente el incremento de las conductas sexuales de riesgo entre HSH descrito en los últimos años. Esto unido al hecho de que el colectivo de HSH acude con mayor frecuencia a realizar la prueba del VIH, podría justificar este aumento en las nuevas infecciones por VIH en los últimos años [Camoni *et al.* 2013; Fernández-Dávila *et al.* 2013].

En nuestra población, se han observado altas tasas de diagnóstico tardío (53.1%), la mitad de los nuevos diagnósticos de infección por VIH tienen un recuento de CD4 inferior a 350 células/ μ L y un 33% cumplen criterios SIDA al diagnóstico. Reducir la tasa de diagnóstico tardío es una prioridad en salud pública puesto que un diagnóstico temprano permite el acceso precoz al tratamiento y reduce el riesgo de transmisión de VIH, además de evitar el riesgo de comorbilidades a largo plazo [Phillips *et al.* 2007; INSIGHT START study group *et al.* 2015]. Para alcanzar este objetivo, los CDC y el Preventive Services Task Force (USPSTF) estadounidenses recomiendan la realización de la prueba del VIH, al menos una vez, entre las personas de entre 15 y 65 años [Branson *et al.* 2006; Moyer *et al.* 2013]. En España, la serología de VIH se realiza en caso de conducta de riesgo o sospecha clínica, pero todavía no está implantada de forma rutinaria. La tasa de diagnóstico tardío observada en nuestra población, que además ha permanecido estable durante todo el periodo de estudio, es similar a la registrada en otros países de Europa y en España, lo que sugiere que el diagnóstico precoz continúa siendo un reto para la mayoría de los países [Palacios *et al.* 2008; European Centre for Disease Prevention and Control, 2010; Dolpech *et al.* 2013; Shen *et al.* 2013]. Por tanto, es fundamental continuar identificando las características de las nuevas infecciones por VIH para optimizar las estrategias de prevención y el diagnóstico precoz de la infección por VIH [Camoni *et al.* 2013; Loconsole *et al.* 2013].

La caracterización de los subtipos genéticos de VIH-1 en los nuevos diagnósticos nos permite conocer la dinámica de la epidemiología molecular de la infección por VIH en nuestra área geográfica [Zhang *et al.* 2010; Hemelaar *et al.* 2011]. La distribución global de los subtipos de VIH-1 refleja la complejidad de esta infección. El subtipo B

tiene una prevalencia de más del 90% en el oeste de Europa y Estados Unidos aunque representa sólo el 11% de las infecciones por VIH a nivel mundial [Hemelaar *et al.* 2011; Luft *et al.* 2011]. Sin embargo, en las últimas dos décadas la prevalencia de los subtipos no-B en Europa se ha ido incrementando progresivamente, debido fundamentalmente a los movimientos poblacionales. De hecho, aunque los subtipos no-B son más frecuentes en la población de origen no caucásico, su prevalencia en algunos países europeos asciende a más del 15% de las nuevas infecciones en personas de origen caucásico [Bracciale *et al.* 2009; Monge *et al.* 2012; Abecasis *et al.* 2013; Chaix *et al.* 2013]. De manera similar, la prevalencia de subtipos no-B ha aumentado también en la población de origen español desde el 1.5% en 2000-2002 al 11% en 2007-2010 [Treviño *et al.* 2011; Monge *et al.* 2012].

La prevalencia de los subtipos no-B observada en nuestra población (34.4%) es mucho más elevada que la descrita en otras cohortes españolas como la cohorte de la Red Española de Investigación en SIDA - CoRIS (15.9%) y presenta también una distribución de subtipos diferente. Mientras que las tasas de CRFs alcanzan casi el 10% de todas las infecciones por VIH en España, siendo el CRF02_AG la variante no-B más frecuente con una prevalencia que alcanza el 40% en el área de Madrid [De Mendoza *et al.* 2009; Treviño *et al.* 2011; Monge *et al.* 2012], la prevalencia de CRFs en nuestra población es mucho menor (3%). En cambio, las infecciones por subtipo F, que causan menos del 1% de las infecciones a nivel mundial y representan el 1.6% en CoRIS, afectan a uno de cada cuatro nuevos diagnósticos en nuestra cohorte [Hemelaar *et al.* 2011; Luft *et al.* 2011; Monge *et al.* 2012]. La prevalencia descrita para el subtipo F varía entre las diferentes áreas geográficas. En Brasil, el subtipo F supone aproximadamente un 10-

20% de las infecciones por subtipos no-B [Dias *et al.* 2009; Hemelaar *et al.* 2011] y Rumanía tiene la prevalencia más alta descrita (> 70%) debido a la transmisión parenteral (por transfusión de productos sanguíneos no evaluados para infección por VIH y/o el empleo repetido de agujas no esterilizadas) en niños a finales de la década de los 80 [Apetrei *et al.* 1998]. Esta asociación con parámetros demográficos sugiere patrones epidémicos muy compartimentalizados, determinados por características sociales y de conducta de los pacientes [Abecasis *et al.* 2013].

En esta línea, datos observacionales sugieren que los subtipos no-B se transmiten mejor por vía heterosexual [Yirrell *et al.* 2008; Lai *et al.* 2012]. De hecho, se ha descrito recientemente la diseminación del subtipo F entre varones heterosexuales en Italia y hasta un 68% de los pacientes con subtipo F en Brasil son mujeres infectadas por vía heterosexual [Monteiro *et al.* 2009; Lai *et al.* 2012]. En nuestro estudio, no obstante, el subtipo F se transmite principalmente en HSH (79.2%). Recientemente, se ha descrito en Galicia una rápida expansión del subtipo F entre los nuevos diagnósticos de infección por VIH entre HSH durante 2010-2011 y el análisis filogenético sitúa el origen de este grupo en Brasil, donde la prevalencia de subtipo F es también elevada [Thomson *et al.* 2012; Pernas *et al.* 2014]. El reconocimiento de la alta prevalencia de subtipo F en nuestra población puede tener relevancia clínica dado que los subtipos no-B se han relacionado con una rápida progresión de la enfermedad, una barrera genética más baja para el desarrollo de resistencia a fármacos y diferente respuesta al TAR [Yirrell *et al.* 2008; Chaix *et al.* 2013; Pernas *et al.* 2014].

Las guías de tratamiento para la infección por VIH recomiendan la realización de un estudio de resistencias a todos los pacientes antes de iniciar el tratamiento,

independientemente de la evidencia de infección reciente [EACS guidelines 2015; DHHS guidelines 2015]. La transmisión de variantes de VIH resistentes a fármacos está bien documentada y se asocia con una respuesta virológica subóptima a los fármacos de primera línea, limitando las opciones terapéuticas [Sagir *et al.* 2007; Bracciale *et al.* 2009]. La prevalencia de resistencias transmitidas a fármacos (transmitted drug resistances, TDR) varía entre 9-24% en Europa y el 3-15% en España [Wittkop *et al.* 2011; Monge *et al.* 2012; Monge *et al.* 2014]. Mientras que en algunos estudios se observa una prevalencia de TDR estable o con tendencia al descenso, otros estudios muestran un incremento en dicha prevalencia [Sagir *et al.* 2007; Monge *et al.* 2012; Rodríguez-Rodríguez *et al.* 2013]. En nuestra población se observó un descenso significativo en TDR desde el 10.2% en el periodo 2004-2008 al 2.6% en el periodo 2009-2013. En Europa, las tasas de TDR más elevadas se describen para los ITIAN (5.4%) seguido de los ITINAN (3%) y los IP/r (2.4%) [Wittkop *et al.* 2011]. Estas prevalencias son similares a las descritas en la cohorte española CoRIS [Monge *et al.* 2012] y también similar a la observada en nuestra población (2.5% para ITIAN e ITINAN) con una prevalencia muy baja de resistencia a IP/r (0.3%).

En España, la tasa de TDR para ITINAN ha descendido desde un 5.2% en 2007 a 2.8% en 2011 en los pacientes naive, pero no se observaron cambios para las TDR asociadas a ITIAN o IP/r [Monge *et al.* 2012; Monge *et al.* 2014]. En nuestra población, en los últimos 5 años, se observó un descenso en las tasas de TDR a ITIAN e ITINAN (6.1% en 2004-2008 a 1.8% en 2009-2013), e IP/r (2% a 0%). Se ha propuesto, que los cambios en las características de la epidemia por VIH, caracterizada por un incremento significativo en los subtipos no-B en los países europeos, podría parcialmente justificar

el hallazgo de una prevalencia reducida de algunas TDR en los últimos años, dada la alta prevalencia de los subtipos no-B en las poblaciones que emigran desde países con acceso más limitado al tratamiento [Walèria-Aleixo *et al.* 2008; Monge *et al.* 2012].

Esta prevalencia de TDR puede tener su influencia en las recomendaciones diagnósticas y de tratamiento en el futuro próximo. De hecho, el límite del coste-beneficio para realizar los estudios genotípicos en pacientes naive antes de iniciar TAR se ha establecido en una prevalencia de TDR superior al 5% [Sax *et al.* 2005]. En vista de la baja prevalencia de TDR en España, especialmente para la familia de IP/r, algunos expertos han sugerido que podría no ser necesario realizar un test de resistencia basal a los IP/r [Monge *et al.* 2012; Monge *et al.* 2014]. Esta aproximación podría ser también interesante en nuestra población, pues la prevalencia global para TDR es del 3.7% con un descenso en los últimos 5 años y una clara tendencia al descenso de las mutaciones de resistencia tanto para ITIAN, como para ITINAN e IP/r.

Una de las limitaciones de nuestro estudio es la falta de secuencias de proteasa y transcriptasa inversa, especialmente en el periodo 2004-2008, cuando no se recomendaba realizar un estudio de resistencias genotípicas a los pacientes naive antes de iniciar el TAR, y por tanto, la imposibilidad de determinar el subtipo de VIH en estos pacientes [Vandamme *et al.* 2004; Recommendations from GeSIDA, 2007].

En resumen, las nuevas infecciones por VIH han aumentado en los últimos 5 años con una alta prevalencia de diagnóstico tardío y eventos SIDA. Estos datos subrayan la necesidad de realizar cribados más activos para la infección por VIH y promover su diagnóstico precoz. Existe una alta prevalencia de subtipo F entre los nuevos diagnósticos de infección por VIH, mayoritariamente en HSH. Estos hallazgos son

importantes para el manejo clínico de estos pacientes y establecer las estrategias más óptimas para la prevención, diagnóstico y manejo clínico.

7.2 Discusión Estudio II: Elevada Prevalencia del Subtipo F en los Nuevos Diagnósticos de Infección por VIH-1 en el Noroeste de España y Evidencia de Peor Respuesta al Tratamiento Antirretroviral.

Históricamente, la epidemia del VIH en Galicia se ha caracterizado por una elevada diversidad genética probablemente debida a los movimientos migratorios de su población [Thomson *et al.* 2001]. Además, en los últimos años, se ha descrito un aumento de la prevalencia de los subtipos no-B en el oeste de Europa [Abecasis *et al.* 2013]. Este estudio confirma la diseminación continuada del subtipo F entre HSH en nuestra área sanitaria, y por primera vez se evidencia una respuesta subóptima al TAR al compararlo con pacientes infectados por el subtipo B. Así, la tasa de respuesta virológica (ARN-VIH < 50 copias/mL) fue significativamente inferior en los pacientes infectados por subtipo F comparado con el subtipo B, a semana 24 (31% vs. 78.3%, respectivamente), 48 (51.7% vs. 85.2%) y 96 (61.1% vs. 94.3%).

Respecto a la respuesta al tratamiento, hay que tener en cuenta que las diferencias genéticas entre los diferentes subtipos del VIH-1, pueden tener su influencia en el tropismo celular, la cinética de replicación viral, la evasión del sistema inmunológico y así modular la progresión de la enfermedad y la susceptibilidad a los fármacos antirretrovirales [Holguín *et al.* 2006; Kantor, 2006; Kiwanuka *et al.* 2008; Geretti *et al.* 2009]. En este sentido, hay que tener en cuenta que la mayoría de los fármacos antirretrovirales se han diseñado teniendo en cuenta las variantes de subtipo B [Taylor *et al.* 2008; Scherrer *et al.* 2011]. Diversos estudios han sugerido una menor tasa de fracaso virológico para los subtipos A y CRF01_AG, y una mayor rapidez en alcanzar la supresión virológica para los subtipos C y A [Geretti *et al.* 2009; Scherrer *et al.* 2011].

Se ha sugerido que la rapidez para alcanzar la supresión virológica en los subtipos C y A podría estar relacionada con una carga viral más baja [Geretti *et al.* 2009]. De hecho, las guías de práctica clínica indican que aquellos pacientes con cargas virales elevadas pueden tardar más tiempo en alcanzar la supresión virológica [DHHS guidelines 2015; Documento de consenso de GeSIDA, 2016].

En este sentido, hay que destacar que algunos estudios han observado que el subtipo F tiene una mayor capacidad replicativa al compararlo con otros subtipos [Poveda *et al.* 2008]. Estos resultados coincidirían con los valores significativamente más elevados de carga viral plasmática en el momento del diagnóstico en los pacientes con subtipo F (5.3 vs. 4.9 log copias/mL) en comparación con los subtipos B, que hemos observado en nuestra población. Sin embargo, en el análisis multivariado, además de la carga viral basal, la infección por subtipo F se asocia de forma independiente con una menor respuesta virológica. Los factores que no se han asociado a esta peor respuesta virológica fueron el tiempo hasta el inicio de TAR, la cifra basal de CD4 y el régimen de TAR utilizado (combinación de 2 ITIAN con ITINAN frente a la combinación con IP/r).

Algunos estudios han resaltado la relevancia de los polimorfismos genéticos naturales que confieren resistencia a determinados fármacos antirretrovirales en pacientes naive infectados por subtipos no-B [Poveda *et al.* 2008; Garrido *et al.* 2011]. En este estudio, no se observaron diferencias en la prevalencia de polimorfismos asociados con resistencias a fármacos en las secuencias de la transcriptasa inversa y la proteasa de las variantes virales de subtipos B y F. Sin embargo, se observaron algunas diferencias en polimorfismos secundarios que tendrían un menor impacto en el desarrollo de resistencias. Por ejemplo, la mutación V106I, que se asocia con resistencia de bajo

nivel a ITINAN (etravirina) [Poveda *et al.* 2008; Vingerhoets *et al.* 2011], se encontró con mayor frecuencia entre los pacientes con subtipo F comparado con el subtipo B (83.8% vs. 3.5% respectivamente, $p < 0.001$). De manera similar, las mutaciones L10V, M36I y L89M que se asocian con resistencia a los IP/r, son más frecuentes entre las proteasas de subtipo F comparado con las de subtipo B (91.2% vs 6.3%; 89.1% vs 32.2%; y 91.2% y 8.4% respectivamente; $p < 0.001$). La presencia de estos polimorfismos se ha asociado con una menor susceptibilidad al IP/r tipranavir. Sin embargo estos polimorfismos no se asociaron con un impacto en la susceptibilidad del IP/r darunavir [Poveda *et al.* 2008]. Ninguno de los pacientes incluidos en el estudio estaba en tratamiento con combinaciones que incluyeran etravirina o tipranavir. Por tanto, en este caso, la presencia de estos polimorfismos que se asocian con una menor susceptibilidad a estos fármacos, no justificaría la peor respuesta a TAR observada entre los pacientes con subtipo F. Por tanto, es necesario evaluar de forma más detallada los mecanismos moleculares que podrían explicar una menor susceptibilidad de las variantes de subtipo F a los fármacos actualmente empleados en la práctica clínica.

Una mala adherencia al TAR en el subgrupo de pacientes con subtipo F podría ser otra posible explicación para las bajas tasas de respuesta virológica observada. Sin embargo, y aunque no se ha realizado una medida directa de la adherencia en este estudio, se ha señalado un alto grado de adherencia al TAR en la población de HSH respecto a otros grupos de riesgo [Giordano *et al.* 2009]. Por otra parte, la tolerabilidad a los fármacos antirretrovirales o su diferente posología son factores que pueden relacionarse con la adherencia, sin embargo, tampoco se observaron

diferencias en cuanto a los regímenes de TAR iniciados durante el periodo de estudio. Finalmente, se han observado incrementos similares en el recuento de linfocitos CD4 en ambos grupos, a las 48 y 96 semanas tras el inicio del TAR, por lo que una mala adherencia entre los pacientes con subtipo F parece una explicación poco probable para las menores tasas de respuesta virológica observadas.

En resumen, el subtipo F es el subtipo no-B más prevalente entre los nuevos diagnósticos de infección por VIH en nuestra área, con una transmisión preferentemente entre HSH. Por primera vez se identifica una respuesta virológica al TAR más lenta en los pacientes con subtipo F. El subtipo F y la elevada carga viral de los pacientes en el momento del diagnóstico son los principales determinantes de la peor respuesta al TAR. Dadas las potenciales implicaciones clínicas de estos resultados, es necesario realizar estudios adicionales que permitan identificar las razones que puedan explicar la peor respuesta al TAR en pacientes infectados por el subtipo F.

7.3 Discusión Estudio III: Impacto de los Blips y los Episodios de Baja Viremia en Pacientes VIH+ con Supresión Viroológica con Tratamiento Antirretroviral.

Las consecuencias clínicas y el manejo de los pacientes que experimentan blips o viremia de bajo nivel durante el TAR no están bien establecidas. Este estudio sugiere que los pacientes con infección por VIH que alcanzan la supresión virológica con TAR pero tienen tres o más determinaciones consecutivas de carga viral plasmática detectable pero no-cuantificable (ARN-VIH < 20 copias/mL) o aquellos con blips, tienen más riesgo de fracaso virológico (FV). De hecho, solo aquellos pacientes con tres o más determinaciones consecutivas de viremia detectable y no cuantificable muestran un mayor riesgo de fracaso virológico por encima de 200 copias/mL.

El objetivo del TAR y el umbral para la supresión virológica se han definido históricamente según los límites de detección de los ensayos comerciales disponibles en cada momento. Así, estos límites de detección han ido cambiando desde 400 copias/mL para los ensayos de primera generación, hasta 50 copias/mL para los de segunda generación y más recientemente, hasta 20 copias/mL, el límite de detección más bajo de los ensayos comerciales actualmente utilizados en la práctica clínica [Schuurman *et al.* 1996; Sun *et al.* 1998; Ruelle *et al.* 2012].

Las guías actuales de práctica clínica para el manejo y tratamiento de la infección por VIH señalan que el objetivo del TAR es mantener la supresión virológica por debajo de 50 copias/mL [EACS guidelines 2015; Documento de consenso de GeSIDA, 2016]. Sin embargo, en pacientes con TAR supresor, se han descrito episodios de viremia residual, transitoria o persistente, por debajo de 50 copias/mL [Palmer *et al.* 2008; Amendola *et al.* 2011; Doyle *et al.* 2012]. El origen de esta viremia residual es

controvertido, y podría explicarse por la liberación de virus como consecuencia de la activación de linfocitos CD4 infectados de forma latente, o por la replicación viral como consecuencia de un tratamiento subóptimo, con el consiguiente riesgo de selección de mutaciones de resistencia [Jones *et al.* 2007; Sigal *et al.* 2011; Doyle *et al.* 2012].

La relevancia clínica de esta viremia de bajo nivel por debajo de 50 copias/mL o incluso de la detección de ARN-VIH por debajo de los límites de cuantificación (< 20 copias/mL) de los ensayos comerciales se desconoce [Laprise *et al.* 2013].

En este escenario es necesario determinar la frecuencia de estos eventos y su impacto en el éxito del tratamiento de los pacientes con infección por VIH.

En este estudio, se observó una prevalencia de blips del 22%, similar a la encontrada en otros estudios que muestran una prevalencia variable entre el 20 y el 40% [Havlr *et al.* 2001; Greub *et al.* 2002; Sklar *et al.* 2002; Grennan *et al.* 2012; Castro *et al.* 2013]. Además, la prevalencia de episodios aislados de baja viremia intermitente (20-50 copias/mL) fue del 24%, aunque previamente no se habían descrito datos de prevalencia sobre estos episodios. Muchos estudios coinciden en que la presencia ocasional de blips es frecuente y no refleja la replicación viral ni predice FV [Havlr *et al.* 2002; Mira *et al.* 2002; Raboud *et al.* 2002; Sklar *et al.* 2002; Grennan *et al.* 2012] mientras que otros estudios sí encuentran una relación entre ambos [Easterbrook *et al.* 2002; Moore *et al.* 2002; Masquelier *et al.* 2005; García Gascó *et al.* 2008; Laprise *et al.* 2013; Hofstra *et al.* 2014; Ryscaravage *et al.* 2014]. Este estudio coincide con estos últimos que encuentran una asociación entre la presencia de blips y el FV (8.6%, 16.5% y 27.5% a los 12, 24 y 60 meses, respectivamente). Hay que destacar que los pacientes con tres o más determinaciones consecutivas de carga viral detectable pero no

cuantificable (ARN-VIH < 20 copias/mL) es más probable que tengan FV (ARN-VIH > 50 copias/mL). Además, la presencia de tres determinaciones consecutivas de viremia detectable no cuantificable se asocia con un mayor riesgo de FV superior a las 200 copias/mL con tasas de fracaso del 33.7% a los 24 y 60 meses, comparados con tasas inferiores al 5% entre los otros grupos. El análisis multivariado identificó estas diferencias entre grupos y la adherencia al tratamiento como factores predictores independientes de FV.

Estos resultados subrayan la relevancia clínica de la presencia continuada de viremia plasmática por debajo de los límites de cuantificación de los ensayos utilizados actualmente (20 copias/mL). Las guías de práctica clínica actuales consideran que los pacientes con supresión virológica por debajo de 50 copias/mL tienen un adecuado control de la infección por VIH. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que los pacientes con viremia detectable continuada, en al menos 3 determinaciones, por debajo de los límites de cuantificación, muestran un mayor riesgo de FV. Doyle *et al.*, han descrito que la presencia de viremias plasmáticas entre 40-49 copias/mL, y en menor medida, viremias < 40 copias/mL en pacientes con TAR, predicen el FV considerando dos definiciones, por encima de 50 y por encima de 400 copias/mL, independientemente de otros factores asociados al FV (e.j. adherencia, pauta de TAR) [Doyle *et al.* 2012].

Este estudio tiene algunas limitaciones. Globalmente, el número de FV observados es bajo, lo que podría justificar la falta de significación estadística para la asociación entre la presencia de FV y la presencia de blips o determinaciones consecutivas de viremia detectable no-cuantificable, analizados separadamente. Sin embargo, esta asociación

se hace significativa al considerar todos los grupos de viremia en su conjunto. En segundo lugar, no se ha evaluado el impacto del FV en el desarrollo de mutaciones de resistencia a fármacos, pues la mayoría de los FV se produjeron con viremias inferiores a 200 copias/mL.

En conclusión, este estudio añade nuevos datos para una mejor comprensión del impacto de los blips y los episodios de baja viremia en pacientes con TAR estable y supresión virológica. Los resultados del estudio concluyen que los pacientes con viremia persistente detectable por debajo de los límites de cuantificación de los ensayos comerciales actualmente empleados (20 copias/mL), más que los blips, parecen asociarse a un mayor riesgo de FV. Estos hallazgos sugieren que el objetivo del TAR actualmente establecido en alcanzar cargas virales inferiores a 50 copias/mL [Documento de consenso de GeSIDA, 2016] debe de ser revisado y establecerse en función del límite de cuantificación de los ensayos actuales que es 20 copias/mL. Mientras tanto, debe considerarse una monitorización estrecha de estos pacientes con especial insistencia en la adherencia al tratamiento.

CONCLUSIONES

1. El número de nuevas infecciones por VIH se ha incrementado en los últimos 5 años en el área sanitaria de A Coruña. La principal vía de transmisión es la sexual (82%) con un incremento significativo entre hombres que tienen sexo por hombres (54%) en los últimos 5 años.
2. La tasa de diagnóstico tardío en la población de estudio es alta (53%), y hasta la tercera parte de los pacientes se diagnostican con un evento clínico asociado, siendo en el 19.1% de los casos un evento SIDA.
3. La prevalencia de mutaciones de resistencias a los fármacos antirretrovirales en los nuevos diagnósticos de VIH-1 ha disminuido de forma significativa en el área sanitaria de A Coruña desde un 10.2% en el periodo 2004-2008 a un 2.6% en los últimos cinco años (2009-2013). Esta disminución se observó para todas las familias de fármacos antirretrovirales (ITIAN, ITINAN e IP/r).
4. En el área sanitaria de A Coruña, el subtipo F (25.8%) es el subtipo no-B más prevalente entre los nuevos diagnósticos de VIH-1. La prevalencia del subtipo F ha incrementado de forma significativa en el área sanitaria de A Coruña en los últimos 5 años principalmente entre hombres que tienen sexo con hombres. Este hallazgo refleja diferencias a nivel epidemiológico y virológico entre nuestra área sanitaria y el resto de España y Europa.

5. La tasa de respuesta virológica en pacientes VIH+ que inician tratamiento antirretroviral es menor en pacientes infectados por variantes del subtipo F (31%, 51.7% y 61.1%) que en pacientes infectados por variantes del subtipo B (78.3%, 85.2% y 94.3%) a semana 24, 48 y 96, respectivamente. De hecho, estar infectado por una variante del VIH-1 subtipo F y una carga viral plasmática superior a 100.000 copias/mL fueron identificados como factores independientes de peor respuesta al tratamiento.

6. Los episodios de baja viremia intermitente son frecuentes (22.7%) en los pacientes VIH+ en tratamiento antirretroviral con supresión virológica. Concretamente, una viremia detectable y persistente por debajo de los límites de cuantificación de los ensayos comerciales actualmente empleados (20 copias/mL), se asocia con un mayor riesgo de fracaso virológico. Según estos resultados, el objetivo actual del TAR debe de ser alcanzar y mantener una supresión de la viremia plasmática por debajo de los límites de cuantificación (<20 copias/mL) y detección de los ensayos actuales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abecasis AB, Wensing AM, Paraskevis D, Vercauteren J, Theys K, Van der Vijver DA, Albert J, Asjö B, Balotta C, Beshkov D, Camacho RJ, Clotet B, De Gascun C, Griskevicius A, Grossman Z, Hamouda O, Horvan A, Kolupajeva T, Korn K, Kostrikis LG, Kücherer C, Liitsola K, Linka M, Nielsen C, Otelea D, Paredes R, Poljak M, Puchhammer-Stöckl E, Schmit JC, Sönnnerborg A, Stanekova D, Stanojevic M, Struck D, Boucher CA, Vandamme AM. HIV-1 subtype distribution and its demographic determinants in newly diagnosed patients in Europe suggest highly compartmentalized epidemics. *Retrovirology* 2013;10:7.
2. Amendola A, Bloisi M, Marsella P, Sabatini R, Bibbò A, Angeletti C, Capobianchi MR. Standardization and performance evaluation of “modified” and “ultrasensitive” versions of the Abbott RealTime HIV-1 assay, adapted to quantify minimal residual viremia. *J Clin Virol* 2011;52:17-22.
3. Amornkul PN, Karita E, Kamali A, Rida WN, Sanders EJ, Lakhi S, Price MA, Kilembe W, Cormier E, Anzala O, Latka MH, Bekker LG, Allen SA, Gilmour J, Fast PE; IAVI Africa HIV Prevention Partnership. Disease progression by infecting HIV-1 subtype in a seroconverter cohort in sub-Saharan Africa. *AIDS* 2013;27:2775-86.
4. Apetrei C, Necula A, Holm-Hansen C, Loussert-Ajaka I, Pandrea I, Cozmei C, Streinu-Cercer A, Pascu FR, Negut E, Molnar G, Duca M, Pecec M, Brun-Vézinet F, Simon F. HIV diversity in Romania. *AIDS* 1998;12:1079-85.
5. ART CC AC. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet* 2008;372:293-299.
6. Baeten JM, Chohan B, Lavreys L, Chohan V, McClelland RS, Certain L, Mandaliya K, Jaoko W, Overbaugh J. HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads. *J Infect Dis* 2007;195:1177-1180.
7. Barré-Sinoussi F, Chermann J, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220:868-871.
8. Beerenwinkel N, Däumer M, Oette M, Korn K, Hoffmann D, Kaiser R, Lengauer T, Selbig J, Walter H. Geno2pheno: Estimating phenotypic drug resistance from HIV-1 genotypes. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3850-55.
9. Blackard JT, Cohen DE, Mayer KH. Human immunodeficiency virus superinfection and recombination: current state of knowledge and potential clinical consequences. *Clin Infect Dis* 2002;34:1108-14.

10. Bracciale L, Colafigli M, Zazzi M, Corsi P, Meraviglia P, Micheli V, Maserati R, Gianotti N, Penco G, Setti M, Di Giambenedetto, Butini L, Vivarelli A, Trezzi M, De Luca A. Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance in HIV-1 infected patients in Italy: evolution over 12 years and predictors. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:607-615.
11. Branson BM, Handsfield HH, Lampe MA, Janssen RS, Taylor AW, Lyss SB, Clark JE; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Revised recommendations for HIV testing of adults, adolescents, and pregnant women in health-care settings. *MMWR Recomm Rep*. 2006;55:1-17.
12. Camoni L, Raimondo M, Regine V, Salfa MC, Suligo B; regional representatives of the HIV Surveillance System. Late presenters among persons with a new HIV diagnosis in Italy, 2010-2011. *BMC Public Health* 2013;13:281.
13. Castro P, Plana M, González R, López A, Vilella A, Nicolas JM, Gallart T, Pumarola T, Bayaas JM, Gatell JM, García F. Influence of episodes of intermittent viremia (“blips”) on immune responses and viral load rebound in successfully treated HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2013;29:68-76.
14. Chaix ML, Seng R, Frange P, Tran L, Avettand-Fenoël V, Ghosn J, Reynes J, Yazdanpanah Y, Raffi F, Goujard C, Rouzioux C, Meyer L; ANRS PRIMO Cohort Study Group. Increasing HIV-1 non-B subtype primary infections in patients in France and effect of HIV subtypes on virological and immunological responses to combined antiretroviral therapy. *Clinical Infec Dis* 2013;56:880-887.
15. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, Hakim JG, Kumwenda J, Grinsztejn B, Pilotto JH, Godbole SV, Mehenddale S, Chariyalertsak S, Santos BR, Mayer KH, Hoffman IF, Eshleman SH, Piwowar-Manning E, Wang L, Makhema J, Mills LA, de Bruyn G, Sanne I, Eron J, Gallant J, Havlir D,, Swindells S, Ribaud H, Elharrar V, Burns D, Taha TE, Nielsen-Saines K, Celentano D, Essex M, Fleming TR; HPTN 052 Study Team. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 2011;365:493-505.
16. De Felipe B, Pérez-Romero P, Abad-Fernández M, Fernández-Cuenca F, Martínez-Fernández FJ, Trastoy M, Mata RC, Lopez-Cortés LF, Leal M, Viciano P, Vallego A. Prevalence and resistance mutations of non-B HIV subtypes among immigrants in southern Spain along the decade 2000-2010. *Virol J* 2011;8:416.
17. De Luca A, Cingolani A, di Giambenedetto S, Trotta MP, Baldini F, Rizzo MG, Bertoli A, Liuzzi G, Narciso P, Murri R, Ammassari A, Perno CF, Antinori A. Variable prediction of antiretroviral treatment outcome by different systems for interpreting genotypic HIV-1 drug resistance. *J Infect Dis* 2003;187:1934-43.
18. De Luca A, Cozzi-Lepri A, Perno C, Balotta C, Di Giambenedetto S, Poggio A, Pagano G, Tositti G, Piscopo R, Del Forno A, Chiodo F, Magnani G, d'Arminio

- Monforte A; ICoNA drug resistance study group. Variability in the interpretation of transmitted genotypic HIV-1 drug resistance and prediction of virologic outcomes of the initial HAART by distinct systems. *Antivir Ther* 2004;9:743-52.
19. De Mendoza C, Anta L, García F, Pérez-Elías MJ, Gutiérrez F, Llibre JM, Menéndez-Arias L, Dalmau D, Soriano V, on behalf of Platform for Drug Resistance of the Spanish AIDS Research Network. HIV-1 genotypic drug resistance interpretation rules – 2009 Spanish guidelines. *AIDS Rev* 2009;11:39-51.
 20. DHHS guidelines 2015. Panel on antiretroviral guidelines for adults and adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1 infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services. Available at <https://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adultandadolescentgl.pdf>
 21. Dias CF, Nunes CC, Freitas IO, Lamego IS, Oliveira IM, Gilli S, Rodrigues R, Brígido LF. High prevalence and association of HIV-1 non-B subtype with specific sexual transmission risk among antiretroviral naïve patients in Porto Alegre, Brazil. *Rev Inst med Trop S Paulo* 2009;51:191-196.
 22. Documento de consenso de GeSIDA/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (Actualización enero 2016). Panel de Expertos de GeSIDA y Plan Nacional sobre el SIDA. Available at: <http://www.gesida-seimc.org/contenidos/guiasclinicas/2016/gesida-guiasclinicas-2016-tar.pdf>.
 23. Dolpech V, Brown AE, Croxford S, Chau C, Polavarapu V, Cooper N, Rooney G, Yin Z. Quality of HIV care in the United Kingdom: key indicators for the first 12 months from HIV diagnosis. *HIV Med* 2013;14:19-24.
 24. Doyle T, Geretti AM. Low-level viremia on HAART: significance and management. *Curr Opin Infect Dis* 2012;25:17-25.
 25. Doyle T, Smith C, Vitiello P, Cambiano V, Johnson M, Owen A, Philips AN, Geretti AM. Plasma HIV-1 RNA detection below 50 copies/ml and risk of virologic rebound in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2012;54:724-32.
 26. EACS guidelines 2015. European AIDS Clinical Society. Guidelines version 8.0 October 2015. Available at http://www.eacsociety.org/files/guidelines_8_0_english_web.pdf
 27. Easterbrook PJ, Ives N, Waters A, Mullen J, O'Shea S, Peters B, Gazzard BG. The natural history and clinical significance of intermittent viremia in patients with initial viral suppression to < 400 copies/ml. *AIDS* 2002;16:1521-7.

28. Emerman M, Malin MH. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unravelling viral and host cell biology. *Science* 1998;280:1880-4.
29. Eshleman S, Crutcher G, Petrauskene O, Kunstman K, Cunningham SP, Trevino C, Davis C, Kennedy J, Fairman J, Foley B, Kop J. Sensitivity and specificity of the ViroSeq HIV-1 genotyping system for detection of HIV-1 drug resistance mutations by use of an ABI PRISM 3100 genetic analyser. *J Clin Microbiol* 2005;43:813-7.
30. European Centre for Disease Prevention and Control; 2010. European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe: HIV/AIDS surveillance in Europe 2009. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2010.
31. Fernández-Dávila P, Folch C, Ferrer L, Soriano R, Diez M, Casabona J. Who are the men who have sex with men in Spain that have never been tested for HIV? *HIV Med* 2013;14;44-8.
32. Gallo RC, Sliski A, Wong-Staal F. Origin of human T-cell leukaemia-lymphoma virus. *Lancet* 1983;2:962-963.
33. García F, Pérez-Cachafeiro S, Guillot V, Alvarez M, Pérez-Romero P, Pérez-Elías MJ, Viciano I, Blanco JR, López-Dieguez M, de Mendoza C; Cohort of the Spanish AIDS Research Network (CoRIS). Transmission of HIV drug resistance and non-B subtype distribution in the Spanish cohort of antiretroviral treatment naïve HIV-infected individuals (CoRIS). *Antiviral Res* 2011;91:150-3.
34. García-Gascó P, Maida I, Blanco F, Barreiro P, Martín-Carbonero L, Vispo E, González-Lahoz J, Soriano V. Episodes of low-level viral rebound in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: frequency, predictors and outcome. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:699-704.
35. Garrido C, Soriano V, Geretti AM, Zahonero N, García S, Booth C, Gutiérrez F, Viciano I, de Mendoza C. Resistance associated mutations to dolutegravir (S/GSK1349572) in HIV-infected patients-impact of HIV subtypes and prior raltegravir experience. *Antiviral Res* 2011;90:164-167.
36. Geretti AM, Harrison L, Green H, Sabin C, Hill T, Fearnhill E, Pillay D, Dunn D; UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance. Effect of HIV-1 subtype on virologic and immunologic response to starting highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2009;48:1296-1305.
37. Giordano TP, Hartman C, Gilford AL, Backus LI, Morgan RO. Predictors of retention in HIV care among a national cohort of US Veterans. *HIV Clin Trials* 2009;10:299-305.

38. Global Report. UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013. WHO/UNAIDS. Available at [http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS Global Report 2013 en.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf)
39. Grennan JT, Loutfy MR, Su D, Harrigan PR, Cooper C, Klein M, Machouf N, Montaner JS, Rourke S, Tsoukas C, Hogg B, Raboud J; CANOC Collaboration. Magnitude of virologic blips is associated with a higher risk for virologic rebound in HIV-infected individuals: a recurrent events analysis. *J Infect Dis* 2012;205:1230-8.
40. Greub G, Cozzi-Lepri A, Ledergerber B, Staszewski S, Perrin L, Miller V, Francioli P, Furrer H, Battegay M, Vernazza P, Bernasconi E, Günthard HF, Hirschel B, Phillips AN, Telenti A; Frankfurt HIV Clinic Cohort and the Swiss HIV Cohort Study. Intermittent and sustained low-level HIV viral rebound in patients receiving potent antiretroviral therapy. *AIDS* 2002;16:1967-9.
41. Havlir DV, Bassett R, Levitan D, Gilbert P, Tebas P, Collier AC, Hirsch MS, Ignacio C, Condra J, Günthard HF, Richman DD, Wong JK. Prevalence of predictive value of intermittent viremia with combination HIV therapy. *JAMA* 2001;286:171-9.
42. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS* 2011;25:679-89.
43. HIV/AIDS Surveillance in Europe, 2013. Available at www.ecdc.europa.eu.
44. Hofstra LM, Mudrikova T, Stam AJ, Otto S, Tesselaar K, Nijhuis M, Wensing AM. Residual viremia is preceding viral blips and persistent low-level viremia in treated HIV-1 patients. *PLoS One* 2014;9:e110749.
45. Holguín A, Ramirez de Arellano E, Rivas P, Soriano V. Efficacy of antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1 non-B subtypes. *AIDS Rev* 2006;8:98-107.
46. Hue S, Pillay D, Clewley JP, Pybus OG. Genetic analysis reveals the complex structure of HIV-1 transmission within defined risk groups. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:4425-29.
47. INSIGHT START Study Group, Lundgren JD, Babiker AG, Gordin F, Emery S, Grund B, Sharma S, Avihingsanon A, Cooper DA, Fätkenheuer G, Llibre JM, Molina JM, Munderi P, Schechter M, Wood R, Klingman KL, Collins S, Lane HC, Phillips AN, Neaton JD. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *N Engl J Med*. 2015;373:795-807.
48. Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Günthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro JM, Richman DD. International AIDS Society-USA Drug Resistance

- Mutatios Group. Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: Top. HIV Med 2008;16:138-45.
49. Jones LE, Perelson AS. Transient viremia, plasma viral load, and reservoir replenishment in HIV-infected patients on antiretroviral therapy. J Acquir Immune Defic Syndr 2007;45:483-93.
 50. Kantor R. Impact of HIV-1 pol diversity on drug resistance and its clinical implications. Curr Opin Infect Dis 2006;19:594-606.
 51. Karpas A. Human retroviruses in leukaemia and AIDS: reflections on their discovery, biology and epidemiology. Biol Rev Camb Philos Soc 2004;79:911-33.
 52. Kiwanuka N, Laeyendecker O, Robb M, Kigozi G, Arroyo M, McCutchan F, Eller LA, Eller M, Makumbi F, Birx D, Wabwire-Mangen F, Serwadda D, Sewankambo NK, Quinn TC, Wawer M, Gray R. Effect of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtype on disease progression in persons from Rakai, Uganda, with incident HIV-1 infection. J Infect Dis 2008;197:707-713.
 53. Lai A, Simonetti F, Zehender G, De Luca A, Micheli V, Meraviglia P, Corsi P, Bangarelli P, Almi P, Zoncada A, Paolucci S, Gonnelli A, Colao G, Tacconi D, Franzetti M, Ciccozzi M, Zazzi M, Balotta C. HIV-1 subtype F1 epidemiological networks among Italian heterosexual males are associated with introduction events from South America. Plos One 2012;7:e42223.
 54. Laprise C, Pokomandy A, Baril JG, Dufresne S, Trottier H. Virologic failure following persistent low-level viremia in a cohort of HIV-positive patients: results from 12 years of observation. Clin Infect Dis 2013;57:1489-96.
 55. Levy J. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. Microbiol Rev 1993;57:183-9.
 56. Loconsole D, Procacci R, Sallustio A, Quarto M, Germinario C, Chironna M; HIV Regional Coordinators. Surveillance of new HIV infections/diagnoses in Puglia Region (South Italy), years 2007-2011. Ann Ig 2013;5:291-298.
 57. Luft LM, Gill MJ, Church DL. HIV-1 viral diversity and its implications for viral load testing: review of current platforms. Int J Infect Dis 2011; 15:e661-70.
 58. Martínez-Cajas JL, Pai NP, Klein MB, Wainberg MA. Differences in resistance mutations among HIV-1 non-subtype B infections: a systematic review of evidence (1996-2008). J Int AIDS Soc 2009;12:11.
 59. Masquelier B, Pereira E, Peytavin G, Descamps D, Reynes J, Verdon R, Fleury H, Garraffo R, Chêne G, Raffi F, Brun-Vézinet F; APROCO/COPILOTE Study Group. Intermittent viremia during first-line, protease inhibitors-containing therapy: significance and relationship with drug resistance. J Clin Virol 2005;33:75-8.

60. Mastro TD, Kuanusont C, Dondero TJ, Wasi C. Why do subtypes segregate among persons with different risk behaviours in South Africa and Thailand? *AIDS* 1997;11:113-116.
61. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Vigilancia Epidemiológica del VIH/SIDA en España. Actualización 30 junio de 2015. Sistema de información sobre nuevos diagnósticos de VIH. Registro Nacional de casos de SIDA.
62. Mira JA, Macías J, Nogales C, Fernández-Rivera J, García-García JA, Ramos A, Pineda JA. Transient rebounds of low-level viremia among HIV-infected patients under HAART are not associated with virological or immunological failure. *Antivir Ther* 2002;7:251-6.
63. Mocroft A, Vella S, Benfield TL, Chiesi A, Miller V, Gargalianos P, d'Arminio Monforte A, Yust I, Bruun JN, Phillips AN, Lundgren JD. Changing patterns of mortality across Europe in patients infected with HIV-1. EuroSIDA Study Group. *Lancet* 1998;352:1725-1730.
64. Monge S, Guillot V, Alvarez M, Peña A, Viciano P, García-Bujalance S, Pérez-Elías MJ, Iribarren JA, Gutiérrez F, Itziar Casado M, García F; CoRIS. Analysis of transmitted drug resistance in Spain in the years 2007-2010 documents decline in mutations to the non-nucleoside drug class. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:e485-490.
65. Monge S, Guillot V, Álvarez M, Chueca N, Stella N, Peña A, Delgado R, Córdoba J, Aguilera A, Vidal C, García F; CoRIS. Clinically relevant transmitted drug resistance to first line antiretroviral drugs and implications for recommendations. *PLoS One* 2014;9:e90710.
66. Monteiro JP, Alcantara LC, De Oliveira AM. Genetic variability of human immunodeficiency virus-1 in Bahia State, Northeast, Brazil: High diversity of HIV genotypes. *J Med Virol* 2009;81:391-9.
67. Moore AL, Youle M, Lipman M, Cozzi-Lepri A, Lampe F, Madge S, Nesaratnam S, Tyrer M, Cuthbertson Z, Ransom D, Loveday C, Johnson MA, Phillips AN; Royal Free Centre for HIV Medicine. Raised viral load in patients with viral suppression on highly active antiretroviral therapy: transient increase or treatment failure? *AIDS* 2002;16:615-8.
68. Moreno S, Mocroft A, D'Amico A. Medical and societal consequences of late presentation. *Antivir Ther* 2010;15 (Suppl 1):9-15.
69. Moyer VA; U.S. Preventive Services Task Force*. Screening for HIV: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Ann Intern Med.* 2013;159:51-60.

70. Nogales C, Serrano C, Bernal S, Jarana R, Pérez de la Rosa L, Fernández-Palacín A, Almeida C, Martín-Mazuelos E. Study of resistance using the TRUGENE HIV-1 genotyping system and analysis of agreement between rule-based algorithms and virtual phenotyping. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005;23:149-55.
71. Palacios R, Viciano I, Pérez de Pedro I, de la Torre J, Ropero F, Fernández S, Salgado F, Roldán J, de Dios Colmenero J, Márquez M, Santos J; Grupo Malagueño para el Estudio de las Enfermedades Infecciosas. Prevalencia de mutaciones de resistencia primaria en los nuevos diagnósticos de infección por el VIH en la provincia de Málaga. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26:141-145.
72. Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998;338:853-860.
73. Palmer S, Maldarelli F, Wiegand A, Bernstein B, Hanna GJ, Brun SC, Kempf DJ, Mellors JW, Coffin JM, King MS. Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;10:3879-3884.
74. Pasquier C, Millot N, Njouom R, Sandres K, Cazabat M, Puel J, Izopet J. HIV-1 subtyping using phylogenetic analysis of pol gene sequences. *J Virol Methods* 2001;94:45-54.
75. Peeters M, Toure-Kane C, Nkengasong JN. Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials. *AIDS* 2003;17:2547-2560.
76. Pernas B, Grandal M, Mena A, Castro-Iglesias A, Cañizares A, Wyles DL, López-Calvo S, Pértega S, Rodríguez-Ororio I, Pedreira JD, Poveda E. High prevalence of subtype F in newly diagnosed HIV-1 persons in northwest Spain and evidence for impaired treatment response. *AIDS* 2014;28:1837-40.
77. Phillips AN, Gazzard B, Gilson R, Easterbrook P, Johnson M, Walsh J, Leen C, Fisher M, Orkin C, Anderson J, Pillay D, Delpech V, Sabin C, Schwenk A, Dunn D, Gompels M, Hill T, Porter K, Babiker A; UK Collaborative HIV Cohort Study. Rate of AIDS diseases or death in HIV-infected antiretroviral therapy-naive individuals with high CD4 cell count. *AIDS* 2007;21:1717-1721.
78. Popovic M, Sarin PS, Robert-Gurroff M, Kalyanaraman VS, Mann D, Minowada J, Gallo RC. Isolation and transmission of human retrovirus (human T-cell leukemia virus). *Science* 1983;219:856-9.

79. Poveda E, de Mendoza C, Parkin N, Choe S, García-Gasco P, Corral A, Soriano V. Evidence for different susceptibility to tipranavir and darunavir in patients infected with distinct HIV-1 subtypes. *AIDS* 2008;22:611-616.
80. Poveda E, de Mendoza C, Pattery T, González MM, Villacian J, Soriano V. Phenotypic impact of resistance mutations on etravirine susceptibility in HIV patients with prior failure to non-nucleoside analogues. *AIDS* 2008;22:2393-2400.
81. Raboud JM, Rae S, Woods R, Harris M, Montaner JS; INCAS and AVANTI Study Groups. Consecutive rebounds in plasma viral load are associated with virological failure at 52 weeks among HIV-infected patients. *AIDS* 2002;16:1627-32.
82. Recommendation from the GeSIDA/Spanish AIDS Plan regarding antiretroviral treatment in adults with human immunodeficiency virus infection (update January 2007). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007;25:32-53.
83. Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 1988;242:1171-3.
84. Robertson DL, Sharp PM, McCutchan FE, Hahn BH. Recombination in HIV-1. *Nature* 1995;374:124-6.
85. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 2000;288:55-6.
86. Rodriguez-Rodriguez N, Duran A, Bouzas MB, Zapiola I, Vila M, Indyk D, Bissio E, Salomon H, Dilernia DA. Increasing trends in primary NNRTI resistance among newly HIV-1 diagnosed individuals in Buenos Aires, Argentina. *J Int AIDS Soc* 2013;16:18519.
87. Rowland-Jones SL, Whittle HC. Out of Africa: what can we learn from HIV-2 about protective immunity to HIV-1? *Nat Immunol* 2007;8:329-31.
88. Ruelle J, Debaisieux L, Vancutsem E, De Bel A, Delforge ML, Pièrard D, Goubau P. HIV-1 low-level viraemia assessed with 3 commercial real-time PCR assays show high variability. *BMC Infect Dis* 2012;12:100.
89. Ryscaravage P, Kelly S, Li JZ, Harrigan PR, Taiwo B. Significance and clinical management of persistent low-level viremia and very-low-level viremia in HIV-1-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:3585-98.
90. Sabin CA, Schwenk A, Johnson MA, Gazzard B, Fisher M, Walsh J, Orkin C, Hill T, Gilson R, Porter K, Easterbrook P, Delpech V, Bansi L, Leen C, Gompels M,

- Anderson J, Phillips A, UK Collaborative HIV Cohort (UK CHIC) Steering Committee. Late diagnosis in the HAART era: proposed common definitions and associations with mortality. *AIDS* 2010;24:723-727.
91. Sagir A, Oette M, Kaiser R, Däumer M, Fátkenheuer G, Rockstroh JK, Knechten H, Schmutz G, Hower M, Emmelkamp J, Pfister H, Häussinger F; RESINA Study Team. Trends in prevalence of primary HIV drug resistance in Germany. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:843-848.
92. Sax PE, Islam R, Walensky RP, Losina E, Weinstein MC, Goldie SJ, Sadownik SN, Freedberg KA. Resistance testing be performed for treatment-naïve HIV-infected patients? A cost-effectiveness analysis. *Clin Infect Dis* 2005;41:1316-1326.
93. Scherrer AU, Ledergerber B, von Wyl V, Böni J, Yerly S, Klimkait T, Bürgisser P, Rauch A, Hirschel B, Cavassini M, Elzi L, Vernazza PL, Bernasconi E, Held L, Günthar HF; Swiss HIV Cohort Study. Improved virological outcome in white patients infected with HIV-1 non-B subtypes compared to subtype B. *Clin Infect Dis* 2011;53:1143-52.
94. Schuurman R, Deschamps D, Weverling GJ, Kaye S, Tijnagel J, Williams I, van Leeuwen R, Tedder R, Boucher CA, Brun-Vezinet F, Loveday C. Multicenter comparison of three commercial methods for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 1996;34:3016-22.
95. Seelamgari A, Maddukuri A, Berro R, de la Fuente C, Kehn K, Deng L, Dadgar S, Bottazzi ME, Ghedin E, Pumfery A, Kashanchi F. Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front Biosci* 2004;9:2388-413.
96. Shafer R, Schapiro J. HIV-1 drug resistance mutations: an update framework for the second decade of HAART. *AIDS Rev* 2008;10:67-84.
97. Shen Y, Lu H, Wang Z, Qi T, Wang J. Analysis of the immunologic status of a newly diagnosed HIV positive population in China. *BMC Infect Dis* 2013;13:429.
98. Sigal A, Kim JT, Balazs AB, Dekel E, Mayo A, Milo R, Baltimore D. Cell-to-cell spread of HIV permits ongoing replication despite antiretroviral therapy. *Nature* 2011;477:95-98.
99. Sklar PA, Ward DJ, Baker RK, Wood KC, Gafoor Z, Alzola CF, Moorman AC, Holmberg SD; HIV Outpatient Study (HOPS) Investigators. Prevalence and clinical correlates of HIV viremia (“blips”) in patients with previous suppression below the limits of quantification. *AIDS* 2002;16:2035-2041.

100. Spira S, Wainberg MA, Loemba H, Turner D, Brenner BG. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:229-240.
101. Stekler JD, McKernan J, Milne R, Tapia KA, Mykhalchenko K, Holte S, Maenza J, Stevens CE, Buskin SE, Mullins JI, Frenkel LM, Collier AC. Lack of resistance to integrase inhibitors among antiretroviral-naïve subjects with primary HIV-1 infection, 2007-2013. *Antivir Ther* 2015;20:77-80.
102. Sun R, Ku J, Jayakar H, Kuo JC, Brambilla D, Herman S, Rosenstraus M, Spadoro J. Ultrasensitive reverse-transcription-PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 1998;36:2964-2969.
103. Tang MW, Shafer RW. HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications. *Drugs* 2012;72:e1-25.
104. Tatt ID, Barlow KL, Nicoll A, Clewley JP. The public health significance of HIV-1 subtypes. *AIDS* 2001;15 (Suppl 5):S59-71.
105. Taylor BS, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med* 2008;359:1965-66.
106. Thomson MM, Delgado E, Manjón N, Ocampo A, Villahermosa ML, Mariño A, Herrero I, Cuevas MT, Vázquez de Parga E, Pérez-Álvarez L, Medrano L, Taboada JA, Nájera R; Spanish Group for Antiretroviral Studies in Galicia. HIV-1 genetic diversity in Galicia Spain: BG intersubtype recombinant viruses circulating among injecting drug users. *AIDS* 2001;15:509-516.
107. Thomson MM, Fernández-García A, Delgado E, Vega Y, Díez-Fuertes F, Sánchez-Martínez M. Rapid expansion of a HIV-1 subtype F cluster of recent origin among men who have sex with men in Galicia, Spain. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012;59:e49-51.
108. Treviño A, Soriano V, Rodríguez C, Arredondo M, Rivas P, Herrero-Mendoza D, Parra P, del Romero J, Anta L, Puente S, de Mendoza C. Changing rate of non-B subtypes and coinfection with hepatitis B/C viruses in newly diagnosed HIV type 1 individuals in Spain. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011;27:633-8.
109. Van Griensven F, de Lind van Wijngaarden JW, Baral S, Grulich A. The global epidemic on HIV infection among men who have sex with men. *Cur Opin HIV AIDS* 2009;4:300-307.
110. Vandamme AM, Sonnerborg A, Ait-Khaled M, Albert J, Asjo B, Bachelier L, Banhegyi D, Boucher C, Brun-Vézinet F, Camacho R, Clevenbergh P, Clumeck N, Dedes N, De Luca A, Doerr HW, Faudon JL, Gatti G, Gerstoft J, Hall WW, Hatzakis A, Hellmann N, Horban A, Lundgren JD, Kempf D, Miller M, Miller V,

- Myers TW, Nielsen C, Opravil M, Palmisano L, Perno CF, Phillips A, Pillay D, Pumarola T, Ruiz L, Salminen M, Schapiro J, Schmidt B, Schmit JC, Schuurman R, Shulse E, Soriano V, Staszewski S, Vella S, Youle M, Ziermann R, Perrin L. Updated European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing. *Antivir Ther* 2004;9:829-48.
111. Varmus H, Nathanson N. Science and the control of AIDS. *Science* 1998;280:1815.
112. Vasan A, Renjifo B, Hertzmark E, Chaplin B, Msamanga G, Essex M, Fawzi W, Hunter D. Different rates of disease progression of HIV type 1 infection in Tanzania based on infecting subtype. *Clin Infect Dis* 2006;42:843-852.
113. Vercauteren J, Vandamme A. Algorithms for the interpretation of transmitted genotypic HIV-1 genotypic drug resistance information. *Antivir Res* 2006;71:335-42.
114. Vercauteren J, Wensing AM, Van de Vijver DA, Albert J, Balotta C, Hamouda O, Kucherer C, Struck D, Schmit JC, Asjo B, Bruckova M, Camacho RJ, Clotet B, Coughlan S, Grossman Z, Horban A, Korn K, Kostrikis L, Nielsen C, Paraskevis D, Poljak M, Puchhammer-Stockl E, Riva C, Ruiz L, Salminen M, Schuurman R, Sonnerborg A, Stanekova D, Stanojevic M, Vandamme AM, Boucher CA. Transmission of drug-resistant HIV-1 is stabilizing in Europe. *J Infect Dis* 2009;200:1503-1508.
115. Vingerhoets J, Nijs S, Tambuyzer L, Hoogstoel A, Anderson D, Pichio G. Similar predictions of efavirenz sensitivity regardless of genotypic testing method used: comparison of available scoring systems. *Antivir Ther* 2012;17:1571-1579.
116. Wainberg MA. HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. *AIDS* 2004;18:S63-68.
117. Waléria-Aleixo A, Martins AN, Arruda MB, Brindeiro RM, Da-Silva RM, Nobre FF, Greco DB, Tanuri A. Drug resistance mutation profile and accumulation kinetics in human immunodeficiency virus-positive individuals infected with subtypes B and F failing highly active antiretroviral therapy are influenced by different viral codon usage patterns. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:4497-4502.
118. Wensing AM, Calvez V, Gunthard HF, Johnson VA, Paredes R, Pillay D, Shafer RW, Richman DD. 2014 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top Antivir Med* 2014;22:642-50.
119. Wheeler WH, Ziebell RA, Zabina H, Pieniazek D, Prejean J, Bodnar UR, Mahle KC, Heneine W, Johnson JA, Hall HI. Prevalence of transmitted drug resistance associated mutations and HIV-1 subtypes in new HIV-1 diagnoses, U.S.-2006. *AIDS* 2010;24:1203-1212

-
120. WHO/UNAIDS 2015. Available at [http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/AIDS by the numbers_2015 es.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/AIDS_by_the_numbers_2015_es.pdf)
121. Wittkop L, Günthard HF, 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, Thiébaut R, Castro H, van Sighem AI, Colin C, Kjaer J, Lundgren JD, Paredes R, Pozniak A, Clotet B, Phillips A, Pillay D, Chêne G; 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;11:363-371.
122. Yirrell DL, Shaw L, Campbell E, Burns SM, Cameron SO, Goldberg D. HIV subtypes in Scotland, 2000-2006. *Epidemiol Infect* 2008;136:1069-75.
123. Zhang M, Foley B, Schultz AK, Macke JP, Bulla I, Stanke M, Morgenstern B, Korber B, Leitner T. The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic. *Retrovirology* 2010;7:25.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CDC	Centres for Diseases Control
CoRIS	Cohorte de la Red de Investigación en SIDA
CRF	Circulating recombinant forms
DHHS	Department of Health and Human Services
DNC	Detectable no cuantificable
EACS	European AIDS Clinical Society
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
FV	Fracaso virológico
GeSIDA	Grupo de Estudio de SIDA (Sociedad Española Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica)
gp	Glucoproteína
HR	Hazard ratio
HSH	Hombres que tienen sexo con hombres
INI	Inhibidores de la proteasa
IP/r	Inhibidores de la proteasa
ITIAN	Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos
ITINAN	Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos
mL	Mililitro
ND	No detectable
nm	Nanómetro
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TAR	Tratamiento antirretroviral
TDR	Transmitted Drug Resistance
UDVP	Usuarios de drogas por vía parenteral
URF	Unique recombinant forms
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
WHO	World Health Organization

ANEXOS

ANEXO 1. PUBLICACIONES SURGIDAS DE ESTA TESIS

Pernas B, Mena A, Cañizares A, Grandal M, Castro-Iglesias A, Pértega S, Pedreira JD, Poveda E. *Trends on epidemiological, virological and clinical features among newly diagnosed HIV-1 persons in Northwest Spain over the last 10 years.* J Med Virol 2015;87:1319-26.

Pernas B, Grandal M, Mena A, Castro-Iglesias A, Cañizares A, Wyles DL, López-Calvo S, Pértega S, Rodríguez-Osorio I, Pedreira JD, Poveda E. *High prevalence of subtype F in newly diagnosed HIV-1 persons in northwest Spain and evidence for impaired treatment response.* AIDS 2014;28(12):1837-40.

Pernas B, Grandal M, Pertega S, Cañizares A, Castro-Iglesias A, Mena A, Rodríguez-Osorio I, Tabernilla A, Pedreira JD, Poveda E. *Any impact of blips and low-level viraemia episodes among HIV-infected patients with sustained virological suppression on ART?* J Antimicrob Chemother 2016;71:1051-5.

Paraskevis D, Kostaki E, Beloukas A, Cañizares A, Aguilera A, Rodríguez J, Grandal M, **Pernas B**, Castro-Iglesias A, Mena A, Pedreira JD, Poveda A. *Molecular characterization of HIV-1 infection in Northwest Spain (2009-2013): Investigation of the subtype F outbreak.* Infect Genet Evol 2015;30:96-101.

ANEXO 2. COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS INTERNACIONALES

“Clinical, virological and immunological features of newly HIV diagnosed patients in a medical reference area of Spain over the last 10 years: Still high, still late”. **B. Pernas**, A. Mena, M. Grandal, A. Cañizares, L. Moldes, JD Pedreira, A. Castro-Iglesias, S. López-Calvo, P. Vázquez-Rodríguez, I. Rodríguez-Osorio, E. Poveda. 12th European Workshop on HIV & Hepatitis. Barcelona, 26-28 Marzo 2014.

“High prevalence of subtype F in newly diagnosed HIV-1 persons in northwest Spain and evidence for impaired treatment response”. M. Grandal, **B. Pernas**, A. Castro-Iglesias, A. Cañizares, A. Mena, S. López-Calvo, P. Vázquez-Rodríguez, S. Pérttega, I. Rodríguez-Osorio, JD Pedreira, E. Poveda. 12th European Workshop on HIV & Hepatitis. Barcelona, 26-28 Marzo 2014.

“Molecular epidemiology analysis on HIV-1 epidemic in the Northwest of Spain: evidence for local transmission of subtype F”. E. Poveda, E. Kostaki, A. Cañizares, A. Aguilera, J. Rodríguez, M. Grandal, **B. Pernas**, A. Castro-Iglesias, A. Mena, JD Pedreira, D. Paraskevis. 12th European Workshop on HIV & Hepatitis. Barcelona, 26-28 Marzo 2014.

ANEXO 3. COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS NACIONALES

“Impacto de los blips y los episodios de baja viremia en pacientes con tratamiento antirretroviral y supresión virológica”. **B. Pernas**, M. Grandal, S. Pértega, I. Rodríguez-Osorio, A. Tabernilla, A. Castro-Iglesias, A. Mena, H. Meijide, JD Pedreira, E. Poveda. VII Congreso Nacional de GeSIDA. Madrid, 1-4 Diciembre 2015.

“Episodios de baja viremia (“Blips”) y fracaso virológico en los nuevos diagnósticos de infección por VIH en el área sanitaria de A Coruña en los últimos 10 años”. **B. Pernas**, M. Grandal, A. Castro-Iglesias, A. Cañizares, S. Pértega, I. Rodríguez-Osorio, A. Mena, P. Vázquez, S. López-Calvo, JD Pedreira, E. Poveda. XVII Congreso Nacional sobre el SIDA e ITS. San Sebastián, 6-8 Mayo 2015.

“Episodios de baja viremia (“blips”) y fracaso virológico en los nuevos diagnósticos de infección por VIH en el área sanitaria de A Coruña en los últimos 10 años”. **B. Pernas**, M. Grandal, I. Rodríguez-Osorio, A. Mena, A. Cañizares, A. Castro-Iglesias, S. Pértega, H. Meijide, L. Bello, P. Vázquez, S. López-Calvo, JD Pedreira, E. Poveda. Simposio IndiVIHduality. Castelldefels, 6-7 Marzo 2015.

“Frecuencia y Predictores de la Presencia de Episodios de Baja Viremia (“Blips”) en los Nuevos Diagnósticos de Infección por VIH en el Área Sanitaria de A Coruña en los Últimos 10 años”. **B. Pernas**, M. Grandal, A. Cañizares, A. Castro-Iglesias, S. Pértega, I. Rodríguez-Osorio, A. Mena, P. Vázquez, S. López-Calvo, JD Pedreira, E. Poveda. VI Congreso Nacional de GeSIDA. Málaga, 25-28 Noviembre 2014.

“Elevada Prevalencia del Subtipo F entre los Nuevos Diagnósticos de VIH en Galicia: Menores Tasas de Respuesta Virológica al Tratamiento Antirretroviral entre los Pacientes con Subtipo F frente al Subtipo B”. **Pernas B**, Grandal M, Castro-Iglesias A, Cañizares A, Pértega S, Mena A, Vázquez-Rodríguez P, López-Calvo S; Rodríguez-Osorio I, Pedreira JD, Poveda E. Reunión Una Visión multidisciplinar en el tratamiento y la calidad de vida del paciente con VIH. Reunión de la Sociedad Española Interdisciplinaria de SIDA – SEISIDA. Madrid, 26 Junio 2014.

“Características Clínicas, Virológicas e Inmunológicas de los Nuevos Diagnósticos de Infección por VIH del Área Sanitaria de A Coruña entre los años 2004 y 2012: Evolución Clínica y Respuesta al Tratamiento Antirretroviral.” **B. Pernas Souto**, A. Mena de Cea, J. D. Pedreira Andrade, A. Castro Iglesias, S. López Calvo, P. Vázquez Rodríguez, I. Rodríguez Osorio, M. Grandal Fustes, E. Poveda López. V Congreso Nacional de GeSIDA. Sitges, 19-22 Noviembre 2013.